

Aus der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Veterinärklinik
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Tillmann

**Intravitale Fluorochromierung der Milch
mit Tetrazyklinen im Hinblick auf die
Mastitisdiagnose**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Judah S. Ogaa, B. V. Sc.
Tierarzt aus Luba, Uganda

Gießen 1970

Aus der Ambulatorischen und Geburtshilfflichen Veterinärklinik
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Tillmann

**Intravitale Fluorochromierung der Milch
mit Tetrazyklinen im Hinblick auf die
Mastitisdiagnose**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Judah S. Ogaa, B. V. Sc.
Tierarzt aus Luba, Uganda

Gießen 1970

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Professor Dr. H. Tillmann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 1970



Meinen lieben Eltern und meinem
 verstorbenen Bruder in tiefer
 Verehrung und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung und Fragestellung	7
2. Literaturüberblick	10
2.1. Ursprung der ausgeschiedenen Zellen	10
2.1.1. Allgemeines	10
2.1.2. Histologie der Milchdrüse	10
2.2. Zytologie der Kuhmilch	11
2.2.1. Kolostralphase	11
2.2.2. Frischmelkstadium und Hönepunkt der Laktation	13
2.2.2.1. Epithelzellen	14
Squamöse Epithelzellen	14
Zylinderepithelzellen	14
Kubische Epithelzellen	15
Pseudopolymorphkernige Zellen	16
Mikropseudozellen	16
2.2.2.2. Blutzellen	17
Granulozyten	17
Monozyten	19
Lymphozyten	19
Erythrozyten	20
2.3. Mikroskopische Verfahren für die Mastitisdiagnostik	20
2.3.1. Hellfeldmikroskopie	20
2.3.1.1. Direktausstrich	21
2.3.1.2. Sedimentausstrich	22
2.3.1.3. Übliche Diachrome zur Färbung von Milchausstrichen	22
Toluidinblau	22
Methylenblau	23
Giemsa-Färbung	23
Broadhurst-Färbung	23
Peroxydase-Färbung	23

	<u>Seite</u>
2.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren	24
2.4. Tetrazykline	32
2.4.1. Tetrazyklinfluoreszenz	32
2.4.2. Chemie	35
2.4.3. Wirkungsbereich	36
2.4.4. Diffusion in das Gewebe	37
2.4.5. Ausscheidung mit der Milch	38
3. Eigene Untersuchungen	40
3.1. Material und Methodik	40
3.1.1. Benutzte Medikamente auf Tetrazyklin- basis	40
3.1.1.1. Tetracylin-Suspension ASID (TC)	40
3.1.1.2. Celasin-AE-Suspension CELA (OTC)	40
3.1.1.3. Reverin-Suspension HOECHST (PMT)	41
3.1.2. Supravitalfluorochromierung mit acridinorange	41
3.1.3. Apparative Ausstattung	42
3.1.3.1. Fluoreszenzmikroskop und Zubehör	42
3.1.3.2. Hellfeldmikroskop	43
3.1.3.3. Weitere Geräte	43
3.1.4. Versuchstiere	44
3.1.5. Auswahl der Tiere und Probenentnahme	44
3.1.6. Versuchsgruppen	44
3.1.7. Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung	45
3.1.7.1. Nativpräparate	46
3.1.7.2. Stabilisierte Proben	46
3.1.7.3. Ausstrichpräparate	47
3.1.8. Vorversuche zur Supravital- und Intra- vitalfluorochromierung mit Tetrazyklinen	47

	<u>Seite</u>
3.1.9. Hauptversuche zur Intravitalfluorochromierung mit Tetrazyklinen	49
3.1.9.1. Verabreichung und Dosierung	49
3.1.9.2. Probenentnahme	49
3.2. Versuchsablauf und Ergebnisse	50
3.2.1. Gruppe I (Kühe mit gesunden Eutern)	50
3.2.2. Gruppe II (Sekretionsstörungen)	54
3.2.3. Gruppe III (latente Mastitis und Besiedlung)	59
3.2.4. Gruppe IV (akute und subakute Mastitis)	62
3.2.5. Gruppe V (chronische Mastitis)	69
3.3. Diskussion und Schlußfolgerungen	76
3.4. Zusammenfassung	85
3.5. Discussion Conclusion and Summary	88
3.6. Résumé	98
3.7. Tabellen	101
4. Literaturverzeichnis	112
5. Lebenslauf	124

1. Einleitung und Fragestellung

Die Milch kann nur dann ihren großen nutritiven Wert in der menschlichen Ernährung entfalten, sofern sie frei von pathogenen Mikroorganismen, Toxinen und Fremdkörpern ist. Sie soll so wenige somatische Zellen wie möglich enthalten und einen möglichst geringen Gehalt an saprophytären Keimen aufweisen (TOLLE et al., 1968; TOLLE, 1969).

Die letzten Jahrzehnte legen Zeugnis ab für die rasche Entwicklung auf dem Gebiet für die Diagnose der Mastitiden des Rindes.

Visuelle Untersuchungen und die Beurteilung mit Hilfe von Indikatoren haben sich als sehr unbefriedigend erwiesen.

Die Grundlagen für die Mastitisdiagnose bestehen in der klinischen und bakteriologischen Untersuchung, wobei die zytologische Beurteilung mit zur klinischen Untersuchung gehört. Die bakteriologische Beurteilung bezieht sich auf die Differenzierung der Keime und die Erstellung eines Antibiotogramms.

Der Internationale Milchwirtschaftsverband hat 1966 den Grenzwert von 500 000 Zellen pro ml Milch, bezogen auf das zur normalen Melkzeit gewonnene Anfangsgemelk aus dem einzelnen Euterviertel, verbindlich festgesetzt. Der Zellgehalt wird als ein wesentliches Kriterium für die Beurteilung der Milch und den pathophysiologischen Zustand der Milchdrüse angesehen. Folgende Werte gelten als Richtschnur für die Beurteilung:

Zellgehalt pro ml Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
< 500 000	normale Sekretion	latente Infektion
> 500 000	Sekretionsstörung	manifeste Mastitis

Die Erkenntnis, daß bei Mastitis oder Reizungen der Milchdrüse ein proportionaler Anstieg des Zellgehaltes der Milch erfolgt, führte zur Entwicklung des California Mastitis Tests (in Deutschland Schalmtest genannt) durch SCHALM und NOORLANDER (1957). Dieser Test findet auch heute noch weitgehend Anwendung für die Mastitisdiagnose an Ort und Stelle zur sofortigen Orientierung. Das Prinzip der Reaktion beruht auf dem Vermögen einiger oberflächenaktiver Detergentien, mit der DNA der Zellen eine Verbindung einzugehen, um bei entsprechend hohem Zellgehalt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Konsistenzveränderung des Milch-Detergens-Gemisches zu bewirken.

Darauf fußend entwickelte JAARTSVELD (1961) die Brabanter Mastitis-Reaktion (BMR). Von KIELWEIN und JOHNE (1968) wurde dann die Mulendorfer Mastitis Probe (AMP), auch MDH-Test genannt, eingeführt.

Alle diese Verfahren gehören zu den indirekten Methoden. Ihre Grenzen liegen im Unvermögen, die Zellen zu differenzieren und bakterielle Ursachen ad hoc zu ermitteln.

Die erste Methode zur direkten Bestimmung des Zellgehaltes stammt aus dem Jahre 1910 und wurde von PRESCOTT und BREED eingeführt. Die Methode erlaubt eine quantitative und qualitative Bestimmung des Zellgehaltes, ist jedoch in ihrer Aussagegenauigkeit limitiert, da zahlreiche Fehlermöglichkeiten, nicht zuletzt durch die Person des Untersuchers bedingt, gegeben sind.

Um die Zellzahlbestimmung zu objektivieren, wurde die elektronische Partikelzählung zur direkten Zellzahlbestimmung herangezogen (CULLEN, 1965, TOLLE et al., 1966). Zellen bestimmter Größe können bei geeigneter Vorbereitung und Diskriminatoreinstellung des Gerätes gezählt werden, und auch Bestimmungen des Bakteriengehaltes sind durch die Mikrokoloniezählung möglich (TOLLE, ZEIDLER und

HEESCHEN, 1968). Eine Zelldifferenzierung erfolgt jedoch nicht.

Ogleich für lange Zeit die Methode nach PRESCOTT und BREED als Standardmethode galt, fand dennoch die Fluorochromierung Eingang in die Mastitisdiagnostik (STRUGGER, 1940-44; SCHONBERG, 1946; JUNG, 1947; LÄMMLER, 1952). Sie konnte allerdings noch nicht standardisiert werden. Die am häufigsten verwendeten Fluorochrome waren das Acridinorange und das Auramin.

Erkenntnisse aus jüngerer Zeit ergaben, daß sich die Tetrazykline an Knochen, Zähne und Tumorgewebe anlagern (MILCH et al., 1957; RALL et al. 1957).

Auf diese Tatsache gründete sich die Frage, ob die in umfangreichem Maße bei der Behandlung der Rindermastitiden benutzten Tetrazykline nicht gewisse diagnostische Möglichkeiten eröffnen, indem sie

- a) die ausgeschiedenen somatischen Zellen der Milch färben,
- b) eine Zelldifferenzierung durch unterschiedliche Anfärbung der verschiedenen Zelltypen ermöglichen und
- c) die verschiedenen Mastitis-Erreger spezifisch anfärben, um dadurch
- d) für die diagnostische Intravitalfärbung bei Mastitiden herangezogen werden zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die aufgezeigten Fragen, unter Anwendung fluoreszenzoptischer Methoden, einer Klärung näher zu bringen.

2. Literaturüberblick

2.1. Ursprung der ausgeschiedenen Zellen

2.1.1. Allgemeines

Die in der Milch auftretenden somatischen Zellen stammen entweder aus dem Bereich des Drüsenkörpers und der Zitzen oder auch aus dem Blut. Ihr Auftreten ist abhängig von den verschiedenen physiologischen und pathologischen Gegebenheiten, wie der Laktationsphase (HILLMANN, 1956) und entzündlichen Prozessen. Aus diesem Grunde ist es auch nicht möglich, a l l e Z e l l t y p e n zu jeder Zeit in der Milch nachzuweisen. Das betrifft vor allen Dingen die Kolostralkörperchen und die Zellen aus dem Blut.

E p i t h e l z e l l e n sind immer in der Milch anzutreffen. Sie entstammen der Mamma selbst sowie ihrer Adnexe. Art und Menge geben Aufschluß über das physiologische und pathologische Geschehen im Euter.

2.1.2. Histologie der Milchdrüse

Das Euter des Rindes besteht aus dem verzweigten alveolaren Drüsenparenchym und dem bindegewebigen Stroma (MAYER und KLEIN, 1961).

Das Parenchym besteht aus einer Anzahl von Galaktophoren, die ein weitverzweigtes System bilden, dessen Endgänge sich in die Alveolen ausdehnen. Das bindegewebige Stroma unterteilt dieses Parenchym in Lappen und Läppchen. In den Drüsenlappen sammeln sich die kleinen Gänge der Drüsenläppchen zu den Milchgängen (Ductus lactiferi) und münden in die Drüsenzisterne. Die Abgrenzung zur Zitzenzisterne ist durch die Fürstenbergsche Rosette markiert.

Die Zitzen sind von der drüsenlosen äußeren Haut umschlos-

sen, unter der sich eine bindegewebig-muskulöse Schicht befindet. Die Verbindung des gesamten Hohlraumsystems zur Außenwelt erfolgt durch den mit mehrschichtigem Plattenepithel ausgekleideten Strichkanal.

Die Alveolen sind kleine Zellsäckchen aus Zellen unterschiedlicher Größe. Sie haben eine Basalmembran, eine Lage von Myoepithelien und eine Lage sekretorischer Zellen. Letztere sind kubisch oder zylindrisch und weisen Einschlüsse auf, die je nach Laktationsphase wechseln (GRYNFELTT, 1936, 1937).

Die Histologie der Galaktophoren ist abhängig von ihrer Lage innerhalb der Drüse. Allgemein bestehen sie aus einer Lage myoepithelialer Elemente, die eine Schicht zylindrischer Zellen einschließt.

Ein zweischichtiges Epithel ist in den Ductuli lactiferi anzutreffen. Die Superficialschicht besteht aus zylindrischen, die Basalschicht aus kubischen Epithelzellen.

In der Zisterne liegt zweischichtiges Zylinderepithel vor.

2.2. Zytologie der Kuhmilch

2.2.1. Kolostralphase

Die Kolostralmilch ist gelblich, hochgradig viskös und sehr oft schleimig und von fadenziehender Konsistenz, bevor die Milchdrüse durch den Melk- oder Saugakt nach dem Abkalben erstmalig entleert wird. Sie enthält ein Koagulum aus Eiweiß und Fett, in dem sich geformte Elemente befinden, einschließlich freier Fettröpfchen, verschiedener Zelltypen und den Kolostralkörperchen oder Donné-schen Körpern.

Die zellulären Elemente bestehen hauptsächlich aus mononukleären Zellen, wie Lymphozyten, Monozyten und Histiozyten sowie aus desquamierten Epithelien.

EDELMÜLLER (1953) und GASPARIN (1953) betrachten die Anwesenheit polymorphkerniger Leukozyten im Kolostrum als physiologisch. TILLMANN (1969) ist jedoch der Auffassung, daß diese Zellen nur bei entzündlichen Prozessen auftreten.

Nach BENDA (1893) handelt es sich bei den Epithelzellen um desquamierte Alveolarzellen. Sie treten in nur geringer Zahl auf und können unverändert oder degeneriert sein. Die unveränderten Formen sind mit Fett beladen und erscheinen als Siegelringzellen, wohingegen die degenerierten Formen zahlreiche Kernveränderungen aufweisen. Auch das Plasma kann verändert sein und wird dann mit Fett- oder Proteineinschlüssen überschwemmt (DIERNHOFER, 1950). Diese desquamierten Epithelien sind polymorph und können leicht mit Kolostralkörperchen oder polymorphkernigen Leukozyten verwechselt werden.

DONNÉ (1844-45) beschrieb als erster die Kolostralkörperchen, die später nach ihm als Donnésche Körperchen benannt wurden. Er bezeichnet sie als Aggregationen von Körnchen, die durch eine amorphe Substanz miteinander verbunden sind. Der Durchmesser der Körperchen erreicht durchschnittlich 40 μ . Das Zytoplasma ist mit zahlreichen Granula aus Fett und Protein angefüllt. Frische Zellen haben einen runden, regelmäßigen Kern und weniger Granula. Ältere Zellen zeigen einen unregelmäßigen, gezackten Kern und mehr Granula, oder der Kern fehlt.

Über den Ursprung dieser Körper bestehen Kontroversen. Das führte dazu, daß man sie nach und nach als leukozytär, epithelial und histiozytär einstufte.

Viele Autoren, einschließlich ARNOLD (1914) sowie WEATHERFORD und EMMEL (1924) behaupten, daß sie von polymorphkernigen Leukozyten abstammen. Unter anderen unterstützen GREGOIRE (1931), VON EGGELING (1927) und ENGEL (1957) die Ansicht, daß die Kolostralkörperchen von den Epithelzellen abstammen. Ausgedehnte Untersuchungen von GRYNFELT (1936) zeigen, daß diese Körperchen histiozytären und monocytyären Ursprung haben.

Der Zellgehalt des Frühkolostrums ist sehr hoch und erreicht durchschnittlich Werte von 1 Million pro ml, wobei 100 000 Zellen auf die Donné-schen Körperchen entfallen (nach HEIDRICH, 1960).

Gegen Ende der Laktation erfolgt eine Zunahme der Epithelzellen (HEIDRICH, 1960), die proportional der Involution der alveolären Anteile des Drüsenparenchyms ist. Nähert sich die Trockenphase, beginnt das Auftreten von Kolostralkörperchen (KOESTLER, 1920).

2.2.2. Frischmelkstadium und Höhepunkt der Laktation

Über den Anteil der verschiedenen Zelltypen während dieser Laktationsphasen bestehen ebenfalls unterschiedliche Ansichten.

Vertreter der einen Richtung sind der Meinung, daß epitheliale Zellen dominieren (WINKLER, 1908; HEWLETT et al., 1932; ZLOTNIK, 1947; WAHBY, 1954 sowie WAHBY und NASR, 1957).

Andere glauben jedoch (WIRTH, 1931; ZINN 1937), daß die Epithelzellen nicht dominieren.

Nach der Auffassung von BOURGEOIS (1928), CHRISTIANSEN (1929), WIRTH (1931), DIERNHOFER (1950) und SCHÖNBERG (1956) besteht der größere Prozentsatz der in normaler Milch vorkommenden Zellen aus polymorphkernigen Leukozyten.

VARRIER-JONES (1924) zieht in Betracht, daß Epithelzellen und Lymphozyten in unterschiedlicher Verteilung die zellulären Elemente der normalen Milch bilden.

Dahingegen behauptet BREED (1914), daß trotz des epithelialen Charakters eines großen Teiles der Zellen aus normaler Milch, polymorphkernige Leukozyten in größeren Mengen durch die Epithelschichten der gesunden Milchdrüse in die Milch gelangen können.

2.2.2.1. Epithelzellen

Hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Charakteristika können die Epithelzellen wie folgt klassifiziert werden:

Squamöse Epithelzellen (Plattenepithelien aus dem Strichkanal) wurden von ERNST (1926) als "Hüllen", "Häutchen", "Bälge" oder "Hornzellen" bezeichnet. Sie sind vermehrt im Frischmelkstadium sowie nach gewaltsamem, unsachgemäßem Melken mit der Hand oder bei fehlerhafter Einstellung der Melkmaschine nachzuweisen (SCHULTZE-PETZOLD, 1960). Die dickeren Plattenepithelschuppen der Außenhaut zeigen Abweichungen von ersteren und färben sich nach Giemsa rot, im Gegensatz zu den sich blauviolett färbenden Zellen des Strichkanals.

WAHBY und NASR (1957) haben diese Zellen in 12 % normaler Milchen gesehen. Sie haben einen Durchmesser von 25 bis 50 μ und sind die größten Zellen, die kleine unregelmäßige Kerne enthalten oder kernlos sind.

Zylinderepithelzellen stammen aus der Epithellage der Zisterne oder der großen Galaktophoren. Nach SCHULTZE-PETZOLD (1960) handelt es sich hierbei um längliche, ovale oder auch viereckige Zellen mit blasigem, ovalem Kern und mitunter lang ausgezogener Basis. Im Protoplasma zeigen sich oft Fettröpfchen. Ihr Vorkommen in geringer

Zahl ist normal. Treten sie zahlreich, vor allem in Gruppen oder ganzen Zellverbänden als blumenartige Gebilde in der Milch auf, so ist das stets ein Hinweis auf mechanische oder infektiöse Insulte (WILDE, 1938; SCHULTZE-PETZOLD, 1960).

Kubische Epithelzellen stammen aus der Epithellage der Alveolen und den Gängen der Milchdrüse. WAHBY und NASR (1957) beobachteten, daß sie in verschiedener Form auftreten und daß ihre Größe, in Abhängigkeit von der Menge der Fettröpfchen oder der Anzahl Vakuolen in ihnen, zwischen 12 und 30 μ schwankt. Sie besitzen entweder einen einfachen Kern, der sphärisch oder elliptisch geformt ist und an der Basis oder in der Mitte des Protoplasmas liegen kann, oder der Kern weist schaumige Struktur auf, nachdem er der Auflösung unterlegen war. Er besteht dann aus kleinen, dunklen Granula, die im Plasma verteilt sind, oder aber man sieht nur ein mit Vakuolen gefülltes Zytoplasma.

SCHULTZE-PETZOLD bezeichnet diese Zellen als rundlich bis kurzoval und von wabiger, oft geblähter Struktur. Sie sind zu Beginn (Kolostralzellen) und am Ende der Laktation, vor allem bei subakuten und chronischen Entzündungsprozessen, zu finden.

Diese Formen der Epithelzellen werden auch in Abhängigkeit von den Fetteinlagerungen als Schaumkugeln und Siegelringzellen bezeichnet. Dabei sitzt einem Fettkügelchen förmlich eine kleine Kappe auf. In normaler Milch kommen sie in geringer Anzahl vor (WILDE, 1938).

SCHULTZE-PETZOLD (1960) hält den Nachweis dieser Zellen für bedeutsam hinsichtlich der Mastitis-Diagnostik, besonders im Rahmen von Eutergesundheitsdiensten. Es werden speziell Sekretionsstörungen und chronische Prozesse im Euter erfaßt, da der Nachweis vermehrt bis zahlreich auftretender Zellen darauf hinweist, daß sie aus dem Ver-

band der arbeitstüchtigen Normalzellen als unbrauchbar abgestoßen worden sind. Natürlich muß ihr Auftreten hinsichtlich der Laktationsphase berücksichtigt werden.

Pseudopolymorphkernige Zellen: Degenerierte Formen von Epithelzellen mit polymorph gestalteten Kernen werden häufig in der Milch angetroffen. Man bezeichnet diese Zellen als pseudopolymorphkernig. WAHBY (1954) und WAHBY und NASR (1957) fanden sie in 17 bis 19 % der normalen Milchproben. Ihre Größe variiert zwischen 10 bis 22 μ und zeigt Übergangsstadien zwischen typisch mononukleären Zellen und solchen Zellen, die den echten polymorphkernigen Leukozyten sehr ähnlich sind. Die Kerne weisen Segmentierung und Pyknose oder Karyolyse auf, woraus die unterschiedlichen Formen resultieren (z. B. in der Kolostralphase). In gewissen Fällen ist der Kern auf eine sichelförmige Masse reduziert, die exzentrisch gelagert ist, bzw. an eine Seite des Plasmas ausweicht und damit der Zelle eine ringartige Form verleiht. In anderen Fällen kann der Kern in zwei oder mehrere Abschnitte unterteilt sein, und das Zytoplasma ist mit Granula angefüllt.

Die pseudopolymorphkernigen Zellen können von den echten polymorphkernigen Leukozyten dadurch abgegrenzt werden, indem man berücksichtigt, daß die ersteren ein größeres Zytoplasma haben, das viele Vakuolen und Fettpartikel enthält (WAHBY und NASR, 1957; SCHONHERR, 1965).

Mikropseudozellen: Diese Zellen stellen die Endphase der degenerativen pseudopolymorphkernigen Form dar. Es handelt sich um sehr kleine Strukturen mit kleinem pyknotischen Kern oder Kernbruchstücken und geringem Protoplasmaanteil, meist nur an einer Seite dem Kern angelagert. Ihre Größe beträgt etwa 2 bis 3 μ . Man trifft sie zu 37 % in normaler Milch an. Manche ähneln den kleinen Lymphozyten.

2.2.2.2. Blutzellen

Nach LERCHE (1966) können Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozyten passiv oder aktiv in der Milch auftreten.

Granulozyten

Die aus dem Blut stammenden Zellen, die vornehmlich in der Milch angetroffen werden, sind die polymorphkernigen Leukozyten oder Granulozyten. Ihre Anwesenheit spielt eine entscheidende Rolle für die Mastitisdiagnose, bzw. den Hinweis für das Vorliegen einer Sekretionsstörung. Ihr Durchmesser variiert zwischen 7 und 12 μ , die Gestalt ist rund, elliptisch oder unregelmäßig. Der Kern ist ungleichmäßig in 2 bis 5 Lappen geteilt, das Zytoplasma ist granuliert und erscheint klarer als der Kern, der sich im allgemeinen tief dunkel anfärbt. Je nach der benutzten Färbemethode ist es möglich, zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen Formen zu unterscheiden. Neutrophile werden am häufigsten angetroffen.

Die Meinungen darüber, ob das Auftreten dieser Zellen in der Milch als physiologisch oder pathologisch anzusehen ist, schwanken.

Nach BOURGEOIS (1928), CHRISTIANSEN (1929), WIRTH (1931), DIERNHOFER (1950) und SCHÖNBERG (1956) stellen die Granulozyten den überwiegenden Anteil der Zellen in normaler Milch. Dagegen fand ZINN (1937), daß in normaler Milch nur sehr wenige polymorphkernige Leukozyten anzutreffen sind.

WILDE (1938) beziffert die Normalwerte für Milch aus gesunden Eutern mit 100 000 bis 300 000 Leukozyten pro ml auf Grund seiner Untersuchungen an 13 Kühen.

GRASSI (1932) und ZLOTNIK (1947) sind der Ansicht, daß es zu einer Leukozyteninvasion in das Euter bei Beginn einer

Mastitis sogar schon vor dem Auftreten klinisch erkennbarer Symptome kommt.

WAHBY und NASR (1957) sowie MOURSU und OBIGER (1960) stimmen mit diesen beiden Autoren überein, indem sie ebenfalls die Anwesenheit polymorphkerniger Leukozyten in der Milch als Indikator für die Abweichung des sezernierenden Euters vom Normalen ansehen, die entweder von bakteriellen Infektionen oder mechanischen Verletzungen abhängt.

Die Diskrepanz dieser verschiedenen Auffassungen scheint weitgehend von der Unfähigkeit vieler Untersucher abzuhängen, die echten polymorphkernigen Leukozyten von den pseudopolymorphkernigen Elementen abzugrenzen. Nach CHRISTIANSEN (1929) sind viele Zellen vor der Fixation bereits abgestorben und dadurch in ihrer Chromaffinität und Morphologie verändert.

Nach BLACKBURN (1955) besteht zwischen der Gesamtzahl somatischer Zellen und der Anzahl polymorphkerniger Leukozyten eine hohe Korrelation. Mit zunehmendem Zellgehalt erhöht sich der Leukozytenanteil nicht nur absolut, sondern auch prozentual.

SCHULTZE-PETZOLD (1960) warnt vor einer rein numerischen Leukozytenbewertung und weist auf einen gewissen physiologischen Spielraum hin. Ferner hebt er hervor, daß die Verteilung der Leukozyten im Gesichtsfeld von Bedeutung ist, d. h., ob die Zellen einzeln oder gehäuft auftreten und ob degenerativer Zell- und Kernzerfall vorhanden sind, die als Hinweis auf entzündlich-eitrige Prozesse gelten.

Auf jeden Fall wird heute weitgehend akzeptiert, daß eine absolute Zunahme der polymorphkernigen Leukozyten in direkter Beziehung zu einer mechanisch oder bakteriell ausgelösten Reizung der Milchdrüse steht. Die Anwesenheit von neutrophilen polymorphkernigen Leukozyten wird als

typisch für ein infektiöses Geschehen angesehen, während die eosinophilen und basophilen Granulozyten nach den Literaturangaben nur eine untergeordnete Rolle für die Diagnose der Mastitiden und Sekretionsstörungen spielen.

Monozyten

Diese Zellart wird nur gelegentlich in der unveränderten Milch gefunden. Ihre Gestalt ist rund, die Durchschnittsgröße beträgt 12 μ . Der Kern ist groß, gelappt und meist nierenförmig. Er weist eine aufgelockerte, netzartige Struktur auf. Nach Giemsa färbt sich der Kern nicht so intensiv wie der Granulozytenkern. Das Plasma ist von rauchig-bläulicher Farbe und zeigt vereinzelt eine feine, azurophile Granulation (SINELL, 1966).

Nach BACHMANN (1932) ähneln sie den großen Lymphozyten, WIRTH (1931) bezeichnet sie als einkernige Granulozyten. SCHONHERR (1956) betrachtet sie als identisch mit den Epitheloidzellen.

Literaturangaben zufolge werden Abweichungen des Prozentsatzes in normaler Milch mit Werten von 3 bis 17 % erwähnt (SCHÖNHERR, 1965). WAHBY und NASR (1957) betrachten sie nicht als Bestandteil von normaler Milch.

Lymphozyten

Lymphozyten kommen regelmäßig in gesunder Milch vor. Sie sind rundlich und kleiner als die anderen kernhaltigen Zellen. Ihr Durchmesser beträgt zwischen 6 und 9 μ . Der Kern ist meist kreisrund und färbt sich nach Giemsa schwarzblau. Der in Blutaussstrichen zu erkennende schmale, leuchtend hellblau gefärbte Plasmasaum kann in Milchaussstrichen vielfach fehlen. Gelegentlich findet man etwas größere Zellen, deren Kern eine Eindellung aufweisen kann, was dann zur Verwechslung mit Monozyten führt. BOURGEOIS (1928) faßt die großen Lymphozyten und die Monozyten zur Gruppe der großen mononukleären Zellen zusammen.

Normale Milch enthält ca. 30 bis 36 % Lymphozyten (WIRTH, 1931; BACHMANN, 1937; WAHBY und NASR, 1957). WAHBY ermittelte 1954, daß ihre Häufigkeit derjenigen der Epithelzellen am nächsten kommt.

BEIL (1955) gibt an, daß die Zahl der Lymphozyten bei Sekretionsstörungen und Mastitiden ebenfalls ansteigt, jedoch nicht in dem Maße, wie die der neutrophilen Leukozyten.

Für SCHULTZE-PETZOLD (1960) steht das zahlreiche Auftreten von Lymphozyten immer mit einem krankhaften Prozess im Zusammenhang, wobei in erster Linie an eine Stauungsmastitis zu denken ist. Ferner kommen tuberkulöse und leukotische Prozesse in Betracht.

Erythrozyten

In normaler Milch werden Erythrozyten kaum angetroffen. Ihre Anwesenheit in großer Zahl weist auf Traumen hin, mit Verletzung von Blutgefäßen. Sie sind klein, mit einem Durchmesser von 5 bis 8 μ und färben sich nach Giemsa rosa bis bläulich-rosa an. Ihre Gestalt ist meist durch das Ausstreichen verändert. Unveränderte Zellen sind wegen ihrer kreisrunden Form und der wegen Wulstung des Randes intensiveren Färbung der Peripherie meist nicht zu verkennen (SINELL, 1966).

2.3. Mikroskopische Verfahren für die Mastitisdiagnostik

2.3.1. Hellfeldmikroskopie

Die mikroskopische Bestimmung der in Milch enthaltenen Körperzellen kann sowohl quantitativ als auch qualitativ erfolgen. Im ersten Fall wird die Gesamtzellzahl bestimmt, wohingegen im zweiten Fall die Zelldifferenzierung aus der Gesamtmilch oder aus dem Sediment erfolgt. Die Benutzung der Zählkammer ist möglich (SEELEMANN und OBIGER, 1962; SEELEMANN und MEYER, 1963), das Verfahren wird von HAUKE (1964) jedoch als sehr unbefriedigend bezeichnet.

2.3.1.1. Direktausstrich

Die konventionelle Methode basiert auf dem von PRESCOTT und BREED (1910) entwickelten Verfahren und hat sich seit ihrer Einführung kaum geändert. Verschiedene Modifikationen hinsichtlich der Präparationstechnik, der Größe des Ausstriches und der Färbemethoden sind von verschiedenen Untersuchern eingeführt worden und in den Standardwerken der Literatur erwähnt, u. a. von KLIMMER und SCHÖNBERG (1951), SCHONHERR (1965), LERCHE (1966) etc.

Das Grundprinzip des Verfahrens beruht darauf, daß eine bekannte Milchmenge auf einer bekannten Fläche eines Objektträgers ausgestrichen, luftgetrocknet, entfettet und fixiert und anschließend gefärbt wird. Danach erfolgt die Zählung der Zellen, deren Anzahl nach folgender Formel berechnet wird (LEIDL, SCHALM und LÜPS, 1961):

$$z \cdot x \cdot f$$

Dabei sind:

z = Anzahl Zellen in allen gezählten Gesichtsfeldern

f = Mikroskopfaktor, in Abhängigkeit von der benutzten Optik

Die Formel für f lautet:

$$f = \frac{d}{m \cdot r^2 \cdot g}$$

d = Fläche des Ausstrichs,

m = ausgestrichene Milchmenge,

r = Radius des Gesichtsfeldes und

g = Anzahl der Gesichtsfelder, die ausgezählt wurden.

DIERNHOFER (1950) spricht von der scheinbaren Exaktheit dieses Verfahrens, das in Wirklichkeit aber auch seine Grenzen hat.

MOURSRY und OBIGER (1960) haben die Berechnung wie folgt

modifiziert:

$$F = \frac{A}{G \cdot m} \quad \text{und} \quad Z = F \cdot D$$

Dabei bedeuten:

- F = Faktor des Mikroskops,
- A = Gesamtfläche des Ausstrichs in cm^2 ,
- G = Größe des Gesichtsfeldes in cm^2 ,
- m = ausgestrichene Milchmenge in ml,
- D = durchschnittliche Zellzahl im Gesichtsfeld und
- Z = Zellzahl in 1 ml Milch.

2.3.1.2. Sedimentaustrich

10 ml Milch werden bei 3000 U/Min. 10 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abgießen des überstehenden Rahms und der Magermilch wird mit normierter Platinöse Sediment entnommen und mit einem Tröpfchen physiologischer NaCl-Lösung auf einem Objektträger auf einer Fläche bekannter Größe ausgestrichen. Nach Lufttrocknung und Fixation wird nach einer der konventionellen Methoden gefärbt. Der Zellgehalt wird geschätzt, wobei die Anzahl Zellen pro Gesichtsfeld zugrunde gelegt werden muß.

2.3.1.3. Übliche Diachrome zur Färbung von Milchausstrichen

Für die Studien an somatischen Zellen in der Milch finden verschiedene Diachrome Verwendung, die Vor- und Nachteile aufweisen. Es wird ein kurzer Überblick über die gebräuchlichsten Farbstoffe gegeben und die Anfärbbarkeit der verschiedenen Zellarten erläutert.

Toluidinblau

Die Leukozytenkerne sind schwarzblau gefärbt und scharf gezeichnet, während die Konturen des Zelleibes nur schwach angedeutet sind.

Epithelzellen aus dem Strichkanal und den Milchgängen schimmern zum Teil rötlich.

Bakterien sind deutlich blau gefärbt.

Methylenblau

Der Untergrund des getrockneten Caseins erscheint schwach bläulich, die Zellen heben sich dunkler blau gefärbt ab. Die Differenzierung der Zellarten ist schwierig, sie soll durch die Modifizierung der Färbung nach BEIL (1955) besser möglich sein, da durch das Entfetten durch Isobuthylalkohol bessere Bilder gewonnen werden.

Giemsaefärbung

Die Zellen sind deutlich von dem rosa oder bläulich-violetten Untergrund abgesetzt.

Epithelzellen haben ein blaßblaues Zytoplasma und einen blauvioletten Kern. Das Plasma der Granulozyten ist blaß rosablau oder graublau gefärbt, der Kern tief dunkelblau. Eosinophile und basophile Leukozyten zeigen das für sie typische granuliert Plasma, der Kern der Lymphozyten ist schwarzblau gefärbt.

Broadhurstfärbung

Hierbei erscheinen Zellen und Erreger blau auf rosa Untergrund. Für die Genauigkeit der Zählung dürfte die Färbung von untergeordneter Bedeutung sein. Wichtig ist hier insbesondere die Art der Fixierung, um ein Abschwemmen der Zellen bei dem anschließenden Färbeprozess zu vermeiden.

Peroxydasefärbung

Der Vorteil dieser Methode beruht darauf, daß die feinen Plasma-Granulierungen der neutrophilen Leukozyten durch ihre grünlichbraune bis dunkelbraune Anfärbung deutlich sichtbar gemacht werden können.

2.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren

Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie während der letzten 30 Jahre auf zahlreichen Gebieten Anwendung gefunden hat, wie z. B. der Exfoliativzytologie, Gewebekultur, Virusforschung, Namatologie und weiteren Bereichen, so existieren noch keine standardisierten Methoden für die Mastitis-Diagnostik.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß etliche Autoren darin übereinstimmen, daß dieses Verfahren den herkömmlichen lichtmikroskopischen Methoden überlegen ist. Der Kontrast zwischen den fluoreszierenden Elementen und dem dunklen Untergrund erlaubt eine leichte Bestimmung des Zellgehaltes und die Differenzierung der verschiedenen Zellarten. Darüber hinaus sind Bakterien, Phagozytosen und andere pathologische Veränderungen an den Zellen erkennbar.

Unter **F l u o r e s z e n z** versteht man das Phänomen, daß gewisse Substanzen, wenn sie gegenüber Ultraviolett- oder Blaulichtstrahlen oder auch Röntgenstrahlen exponiert werden, die Eigenschaft haben, langwelligere Strahlen auszusenden als das Erregerlicht (Stoke'sches Gesetz), um dann leuchtend hell zu erscheinen.

Bleibt diese Lichtemission während eines deutlich längeren Zeitraumes nach Beendigung der Anregung durch die Erregerstrahlen bestehen, so spricht man von **P h o s p h o - r e s z e n z**. Beide Phänomene sind als **L u m i n e s - z e n z** bekannt.

Eine Reihe botanischer, zoologischer oder mineralogischer Substanzen fluoreszieren ohne vorhergehende Anregung. Derartige Substanzen zeigen **A u t o -** oder **P r i m ä r - f l u o r e s z e n z** (HEMPERL, 1961). Tritt die Erscheinung der Fluoreszenz **n a c h** Behandlung mit einem Fluoreszenzfarbstoff auf, so spricht man von **S e k u n -**

d ä r f l u o r e s z e n z . Solche Farbstoffe werden nach HAITINGER (1959) als f l u o r o c h r o m e bezeichnet und das Phänomen der Färbung als F l u o r o - c h r o m i e r u n g .

Gegenüber den in der Lichtmikroskopie angewandten Diachromen haben die Fluorochrome den Vorteil, daß sie in extrem niedrigen Konzentrationen benutzt werden können, wodurch die Schädigungen lebender Zellen auf ein Minimum reduziert werden (WITTEKIND, 1962). Sie erlauben daher die Vital-, Intravital- oder Supravitalfärbung von Geweben oder Organismen.

VONWILLER (zit. nach ZIEGLER, 1938) definiert die Vitalfärbung als eine Färbung von Organismen oder Teilen von solchen während des Lebens dieser ganzen Organismen oder ihrer Teile.

STOCKINGER (1964, zit. nach EDER, 1966) ist der Auffassung, daß es schwierig ist, den Begriff "Leben" zu definieren und damit den Terminus "Vital-Färbung". Deshalb schlägt wohl auch WITTEKIND (1962) vor, daß kein Unterschied zwischen Intravital- und Supravitalfärbung gemacht werden sollte, gleichgültig ob eine lebende Zelle innerhalb oder außerhalb des Organismus gefärbt wird.

In dieser Arbeit werden die Termini Vital-, Intravital- und Supravitalfärbung unter dem allgemeinen Begriff der Vitalfärbung verwendet, um die durchgeführten Techniken zu demonstrieren und zwischen ihnen zu differenzieren.

Bei Anwendung von Acridinorange (allein oder mit anderen Farbstoffen kombiniert) ist das Zellbild der nativen Milch generell das Gleiche, obwohl geringe Unterschiede in Abhängigkeit von der Konzentration, dem Milieu sowie den primären und sekundären Filterkombinationen vorkommen. Untersuchungen von OGAA, CZERNICKI und TILLMANN (unveröffentlicht) bestätigen diesbezüglich die Befunde anderer Untersucher.

Von den Epithelzellen zeigen die squamösen Epithelien eine schwach grüne oder rötliche Fluoreszenz. Sie sind häufig kernlos. Demgegenüber haben Zylinderepithelien hellgrüne, schaumige Kerne und rötliches Protoplasma, während kubische Epithelzellen grünliche, kompakte Kerne aufweisen und das Protoplasma Fetteinschlüsse enthält.

Von den aus dem Blut stammenden Zellen sind die Leukozyten am leichtesten zu erkennen. Die polymorphkernigen Leukozyten zeigen einen hellgrünen segmentierten Kern, die Lymphozyten einen kompakten, runden und gleichmäßig grün fluoreszierenden Kern mit schmalem Plasmasaum, und die Monozyten haben einen blaßgrünen Kern.

Das Protoplasma zeigt bei all diesen Zellen verschiedene Farbtöne von blaßgrüner bis rötlicher Färbung.

Rote Blutkörperchen sind häufig schwieriger zu bestimmen. Im allgemeinen fluoreszieren sie gelblich-braun oder orange.

Kolostralkörperchen sind charakterisiert durch die metachromatischen Einschlüsse in ihrem Zytoplasma.

Die ersten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Milch hatten weniger die Bestimmung des Zellgehaltes und die Differenzierung der Zellen zum Ziel. Sie dienten vielmehr dem Nachweis von Krankheitskeimen.

So entwickelte HAGEMANN (1938) eine Fluoreszenztechnik mit Auramin zur Vitalfärbung von Tuberkelbakterien in Sputum, Eiter und Urin. Die Tuberkelbakterien erscheinen dabei als goldgelb fluoreszierende Stäbchen auf violetter Untergrund.

GRAF (1938) konnte mit der Methode nach Hagemann Tuberkelbakterien in Milch nachweisen. Die Identifizierung von Galtstreptokokken, Milchsäurestreptokokken, Mikrokokken, *B. pyogenes* und *E. coli* gelang ihm durch die Fluorochromierung von Milchsedimenten mit Entozon A, gelöst in

76 %igem Alkohol in einer Konzentration von 1 : 100 000.
Die Bakterien fluoreszierten dann weißleuchtend.

STRUGGER (1940) benutzte Acridinorange in Verdünnungen von 1 : 5000 bis 1 : 10 000 für den Nachweis von Bakterien in Körperflüssigkeiten. Seinen Berichten zufolge fluoreszieren lebende Bakterien grün und tote rot.

GOHDE (1944) erzielte eine um 20 % höhere Ausbeute an Galtstreptokokken gegenüber methylenblaugefärbten Präparaten. Bei Fluorochromierung von Milchsedimenten mit in Leitungswasser (p_H 7 bis 7,3) im Verhältnis 1 : 10 000 gelöstem Acridinorange konnte eine rot- oder grünleuchtende Strahlung durch Nachbehandlung des fluorochromierten Ausstriches mit 2 %iger Milchsäurelösung beseitigt werden. Auch hitzefixierte Ausstriche ergaben durch Nachbehandlung mit Milchsäure noch für lange Zeit kontrastreiche Bilder.

SCHÖNBERG (1946) bestätigte die Befunde von STRUGGER anhand seiner Untersuchungen von Milchsedimentausstrichen und war überzeugt, daß die Vitalfärbung mit Acridinorange im Vergleich zu den konventionellen lichtmikroskopischen Methoden für die Zellanalyse und den Erregernachweis besser geeignet sei. Er empfiehlt für den Nachweis von Keimen in Mastitismilch eine Mischung folgender Fluorochrome:

3 Teile Acridingelb	1 : 5 000
3 Teile Acridinorange	1 : 5 000
3 Teile Wasserblau	1 : 5 000

Die frisch zubereiteten Lösungen werden gut gemischt. Eine Öse Milchsediment wird mit einer Öse des Fluorochromgemischs auf einem Objektträger vermenget und mit einem Deckglas bedeckt.

Für den Nachweis von Tuberkelbakterien, Lymphozyten, Epitheloidzellen oder Langhans'schen Riesenzellen empfiehlt SCHÖNBERG die Methode nach Hagemann.

In eingehenden Untersuchungen von JUNG (1947) an Milchproben mit Acridinorange wird ein analytisches Fluoreszenzbild der verschiedenen zellulären Elemente und Bakterien wiedergegeben. Danach sind die polymorphkernigen Zellen mit ihren hellgrün fluoreszierenden Kernen am leichtesten zu erkennen. Lymphozyten haben einen gleichförmigen, kompakten grünen Kern und einen schmalen Protoplasmasaum, während Monozyten blaßgrün mit blassen Punkten erscheinen. Squamöse Epithelien waren oft kernlos und hatten rotgefärbtes Protoplasma. Die Zylinderepithelzellen zeigten große, grüne und schaumige Kerne nebst rötlichem Zytoplasma, die kubischen Epithelien hatten ein rötliches Zytoplasma, das mit Fettröpfchen bedeckt war.

JUNG stellte jedoch fest, daß die Vitalfluorochromierung mit Acridinorange keinen Vorteil gegenüber den Diachromen hinsichtlich der Färbung und Identifizierung von Bakterien in Milch aufweist.

Über die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie für die Keimzahlbestimmung in Milch und Butter liegen Untersuchungen von MÜNCHBERG (1949) und HANGLER (1949) vor.

MÜNCHBERG entwickelte 1951 eine Methode für Blaulichtfluoreszenzmikroskopie getrockneter Milchsedimentausstriche. Die luftgetrockneten Ausstriche werden nacheinander durch Einwirkung von 96 %igem Alkohol und 2 %iger Essigsäure fixiert, mit Aqua dest. gespült, durch vorsichtiges Absaugen der Wasserreste mit Fließpapier getrocknet und anschließend mit Acridinorange 1 : 1000 in Aqua dest. eine Minute gefärbt und wiederum abgespült. MÜNCHBERG konnte mit diesem Verfahren die Zelltypen und Bakterien gut und einfach differenzieren.

Im Anschluß an die Arbeiten SCHONBERG's (1946, 1949) zum Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch nach HAGEMANN erschienen zahlreiche weitere Berichte, unter anderem von JENSEN und GOHDE (1950), RASCH und GOSLING (1951), SCHAU-

MANN (1952), BAUMGARTEN und GILDEMEISTER (1952), LÄMMLER (1952) und EIS (1954).

Kürzlich berichtete SCHMIDT MADSEN (1968) über eine Vitalfärbung mit Acridinorange zur quantitativen und qualitativen Bestimmung somatischer Zellen in Milch. Hierbei werden 1 ml Milch und zwei Tropfen einer 0,1 %igen Acridinorange-Lösung gemischt. Mit einer Breed-Spritze werden 0,01 ml dieser Mischung auf einen Objektträger gebracht und mit einem leicht erwärmten Deckglas von 32 x 24 mm bedeckt, so daß das Präparat eine Dicke von 13 μ hat. Er fand, daß bei 200facher Vergrößerung die Zellstrukturen als gelbgrüne Elemente gegenüber einem dunklen Untergrund zu unterscheiden sind.

SCHMIDT MADSEN stellte einen Regressionskoeffizienten von 1,01 zwischen den Resultaten der gewöhnlichen Lichtmikroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie anhand von 564 Proben fest. Er erhielt die gleiche Zufallsverteilung wie nach der Methode von PRESCOTT und BREED.

Letzte Berichte stammen von KUWILSKY (1970) und KLIMA (1970), die den Wert der Vitalfluorochromierung für routinemäßige diagnostische Labormethoden wiederentdeckt haben.

KUWILSKY beschreibt ein Verfahren für die Fluorochromierung fixierter Blutaussstriche, das er auf Milchaussstriche mit gleichem Erfolg übertrug. Er benutzt zwei Fluorochrome, nämlich:

Fluorochrom I: 0,6 g Acridinorange, gelöst in 1 l Leitfähigkeitswasser, *) p_H 6,5 bis 6,6.

Fluorochrom II: 0,64 g Brillantsulfoflavin, gelöst in 1 l Leitfähigkeitswasser. *)

*) voll entsalztes Wasser

Die Technik der Fluorochromierung schließt folgende Arbeitsgänge ein:

- a) Anfertigung eines sehr dünnen Ausstriches mit einem Deckglas 18 x 18 mm,
- b) lufttrocknen,
- c) Fixation für 3,5 Minuten in Methanol (reinst),
- d) abspülen in Leitungswasser,
- e) Fluorochromierung für 30 Sekunden mit Fluorochrom I,
- f) 20 Sek. mit Aqua dest. oder Leitungswasser spülen,
- g) Gegenfluorochromierung 3 Min. lang mit Fluorochrom II,
- h) mit Leitungswasser abspülen und lufttrocknen.

Bei Blaulichtfluoreszenz erscheinen die Erythrozyten dunkelgrün, die Granulozyten haben ein hellgrünes Zytoplasma und hellrote Kerne. Bei den Eosinophilen sind hell leuchtende, deutlich geformte Granula zu erkennen, während die Basophilen nur blauschwarz sind. Monozyten haben ein dunkleres grünlichblaues Zytoplasma, und ihre nierenförmigen Kerne sind dunkelrot gefärbt. Der runde Kern der Lymphozyten färbt sich rot, während das grüne Zytoplasma kaum zu erkennen ist.

Ein ähnliches Bild erhält man bei Milchsausstrichen. Wegen des Fett- und Proteingehaltes ist der allgemeine Eindruck jedoch etwas dunkler. Die Epithelzellen fluoreszieren mehr gelblich-grün.

Für den Nachweis von verschiedenen Zellelementen, Einschlußkörperchen, Pilzen etc. verwendet KUWILSKY eine Mischung, bestehend aus folgenden Fluorochromen, jeweils in Lösungen von 1 : 1000 in entsalztem Wasser:

- 10 Teile Acridinorange
- 35 Teile Acridingelb
- 5 Teile Coriphosphin
- 1 Teil Rhodamin B.

Diese Mischung ist in dunkler Flasche 7 bis 10 Tage haltbar. Vor Gebrauch wird sie 1 : 6 bis 1 : 20 verdünnt.

Bestandsmilchuntersuchungen erfolgen mittels der elektronischen Zellzählung. Hierzu müssen die Milchproben zunächst mit Formaldehyd stabilisiert werden. Um bei Bedarf die qualitativ-zytologische Untersuchung gleich anschließen zu können, wird dem Stabilisator das Fluorochrom grundsätzlich zugesetzt. Das Stabilisator-Fluorochrom-Gemisch nach KUWILSKY hat folgende Zusammensetzung:

- 1 Liter 10 %igem Formaldehyd werden in Substanz zugegeben:
- 1,4 g Acridinorange,
- 0,4 g Acridingelb und
- 0,1 g Coriphosphin.

KUWILSKY beschickt Teströhrchen auf BMR-Stativen mit je einem Tropfen dieser Lösung. Je Röhrchen wird 1 ml der zu untersuchenden Bestandsmilch zugegeben, das Ganze gut gemischt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend erfolgt die Weiterverarbeitung zur elektronischen Zellzählung. Werden dort erhöhte Zellzahlen ermittelt, kann sofort die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Proben durch Untersuchung der stabilisierten Milch erfolgen.

KLIMA (1970) benutzt eine Mischung von Acridinorange und Acridingelb zur Fluorochromierung von Ausstrichen aus nativer Milch, die folgendermaßen zusammengesetzt ist:

- 6 Teile Acridinorange 1 : 5 000 und
- 4 Teile Acridingelb 1 : 5 000, die mit
- TRIS-Puffer auf p_H 7,5 eingestellt wird.

Eine Platinöse voll gut durchmischter Milch wird mit einer Öse Fluorochrom auf einem Objektträger gemischt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Beurteilung erfolgt im Durchlicht bei Blaulichtanregung, wobei die absoluten Zellzahlen sowie die Differenzierung der Zellen berücksichtigt werden.

2.4. Tetrazykline

2.4.1. Tetrazyklinfluoreszenz

Seit 1957 wurden zahlreiche fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Knochen, Zähnen, Tumorgewebe aus verschiedenen Organbereichen sowie an Gewebekulturen und Pflanzenzellen mit Tetrazyklinen durchgeführt.

Die Tatsache, daß Tetrazykline Fluoreszenz an verschiedenen normalen und pathologisch veränderten somatischen Zellen bewirken und sogar vielfach diagnostische Bedeutung erlangt haben, legte den Gedanken nahe, die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Milch nach Tetrazyklinapplikation durchzuführen.

Nachfolgend wird ein kurzer Literaturüberblick über einige, bisher an Körperzellen erfolgte Untersuchungen hinsichtlich Tetrazyklinfluoreszenz gegeben.

UDENFRIEND (1957) erwähnt, daß Tetrazykline, Oxytetrazykline und Chlortetrazykline grundsätzlich fluoreszieren. Für Tetrazyklin und Oxytetrazyklin liegen die Anregungsmaxima bei 390 nm und die Fluoreszenzmaxima bei 515 bis 520 nm bei pH 11. Die entsprechenden Werte für Chlortetrazyklin sind 355 nm und 445 nm. Alle nativen Tetrazykline fluoreszieren goldgelb bei etwa 515 bis 520 nm.

IBSEN und URIST (1962) bestätigen diese Berichte über die Fluoreszenzcharakteristika von Oxytetrazyklin und zeigen, daß die Anregungs- und Absorptionsmaxima in Abhängigkeit vom p_H und der Anwesenheit von Metallionen variieren.

Folglich sind viele Verfahren in die fluorometrische Analyse der verschiedenen Tetrazykline und ihrer Derivate in pharmazeutischen Präparaten, Futtermitteln und biologischen Materialien eingeführt worden (LEVINE et al., 1949; CHICCARELLI et al., 1956; FELDMAN et al., 1957; SALZMAN, 1950 und weitere Autoren, zit. bei UDENFRIEND, 1969).

Über die in vivo erfolgte Lokalisierung von Tetrazyklinen in Knochen und Zähnen nach parenteraler Verabreichung von Tetrazyklin, Chlortetrazyklin und Oxytetrazyklin haben MILCH et al. (1957, 1958) berichtet.

Im Bereich von frisch proliferiertem Knochengewebe war goldgelbe Fluoreszenz zu beobachten, die über den Beobachtungszeitraum von 10 Wochen bestehen blieb.

Seitdem ist dieses Phänomen in großem Umfang für Untersuchungen über das Knochenwachstum sowie Alterung und pathologische Veränderungen am Skelettsystem herangezogen worden (FROST et al., 1961; WEYMAN et al., 1963; EGER et al., 1964, 1965; EICHLER und WALTER, 1967; DÄMMRICH, 1969; SCHOLZ, 1969).

Es wird angenommen, daß der Mechanismus der Anlagerung von Tetrazyklinen von einer Chelat-Bindung mit Kalziumionen abhängig ist (MILCH, RALL und TOBIE, 1958; IBSEN und URIST, 1962).

Auf dem Gebiet der Tumorforschung sind u. a. Arbeiten von RALL et al. (1957), McLEAY (1958), VASSAR et al. (1960), KLINGER und KATZ (1961), BERK und KANTOR (1962, 1963), SHERMAN et al. (1963), HAVEMANN (1963) sowie SANDLOW und NECHELES (1964) erschienen.

Alle diese Autoren berichten über die Anwendung von Tetrazyklinen für die Diagnostik kanzerogener Gewebe verschiedener Herkunft, hauptsächlich aus Magen und Bronchien. Die spezielle Affinität der Tetrazykline zu Tumorzellen konnte von ABERLE (1963) sowie ENGELBART et al. (1964) nicht bestätigt werden.

TOBIE et al. (1960) berichten über die Lokalisation von Tetrazyklin in vivo in Filarien in einem derartigen Ausmaß, daß sie sogar unter der Haut durch ihre helle goldgelbe Fluoreszenz bestimmt werden konnten.

Die beobachtete Anlagerung von Tetrazyklinen an Knochen, Tumoren und gewisse Parasiten veranlaßte MALT (zit. nach UDENFRIEND, 1969), die Lokalisation in Federn zu untersuchen. Dabei stellte er fest, daß sich Tetrazykline an Keratin nicht binden.

Auch über die Tetrazyklinanlagerung an Mitochondrien lebender Zellen wurde berichtet. So konnten Du BUY und SHOWACRE (1961) zeigen, daß Antibiotika der Tetrazyklingruppe sich selektiv in den Mitochondrien lebender Zellen lokalisieren. In Schnitten des lebenden Gewebes fluoreszieren die Mitochondrien gegenüber dem dunklen Untergrund des Zytoplasmas.

MALATYAN (1962) zufolge zeigt *E. coli* mit Tetrazyklin eine granulierte, polare Fluoreszenz.

CHERNOGRYASKAYA et al. (nach UDENFRIEND, 1969) benutzten Tetrazykline, um die Mitochondrien in den Spermatiden von Grashüpfern zu untersuchen.

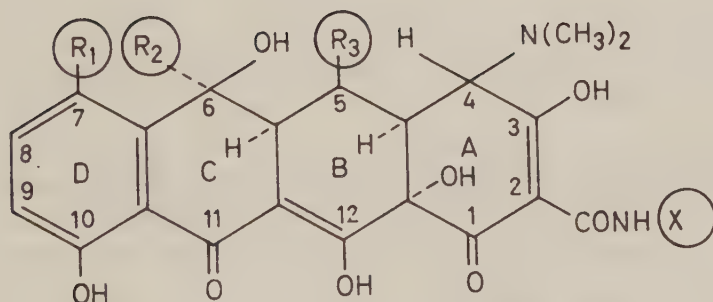
GUTKINA et al. (zit. nach UDENFRIEND, 1969) führten detaillierte Untersuchungen über die intrazelluläre Lokalisierung der Tetrazykline nach in vivo Verabreichung an Tiere durch. Sie kamen zu dem Schluß, daß sich die Tetrazykline tatsächlich in hohem Maße in den Mitochondrien lokalisieren, die sie deutlich und selektiv färben.

Aus jüngerer Zeit stammen Untersuchungen von DRAWERT und RÜFFER-BOCK (1965), die mittels der Tetrazyklin-Fluoreszenztechnik Mitochondrien, Dictyosomen des Golgiapparates sowie das endoplasmatische Retikulum an Zellen von *Allium cepa* dargestellt haben.

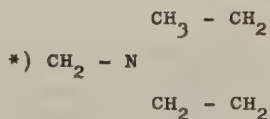
2.4.2. Chemie

Die Tetrazyklin-Gruppe weist die chemische Grundstruktur des Naphthacen-Ringsystems auf. Am Beispiel des Tetrazyklins ist dieses antibiotisch wirksame Grundgerüst dargestellt.

Tetrazykline sind amphotere, kristalline Verbindungen, die mit Säuren und Alkali lösliche Salze bilden. Als amphotere Substanzen sowie als verschiedene Salze sind sie handelsüblich. Die Unterschiede sind aus der Strukturformel und der Tabelle ersichtlich.



Tetrazykline	Abkürzung	$\textcircled{R_1}_7$	$\textcircled{R_2}_6$	$\textcircled{R_3}_5$	X
Tetrazyklin	TC	H	CH_3	H	H
Oxytetrazyklin	OTC	H	CH_3	OH	H
Chlor-Tetrazyklin	CTC	Cl	CH_3	H	H
Demethyl-Chlor-tetrazyklin	DMCT	Cl	H	H	H
Roli-Tetrazyklin (Pyrrolidino-methyl-Tetrazyklin)	PMT	H	CH_3	H	*)



Angaben über chemisch-physikalische Eigenschaften der Tetrazykline sind der Fachliteratur zu entnehmen.

2.4.3. Wirkungsbereich

Die einzelnen Tetrazykline weisen ein gleichartiges Wirkungsspektrum und eine komplette Kreuzresistenz auf. Obwohl Unterschiede in der Wirkungsintensität, den chemisch-physikalischen Eigenschaften, den Resorptions-, Diffusions- und Extraktionsverhältnissen sowie der Verträglichkeit vorhanden sind, sind die therapeutischen Ergebnisse weitgehend gleichartig.

Der Wirkungsbereich erstreckt sich auf die grampositiven und die meisten gramnegativen Bakterien, ferner auf Spirochäten, Leptospiren, Amöben, Rickettsien und die Gruppe der "großen" Viren.

In den üblichen therapeutisch erreichbaren Konzentrationen wirken die Tetrazykline *b a k t e r i o s t a t i s c h* . Bei proliferierten Keimen ist die Wirkung zuverlässiger als in der Ruhephase. In vivo können über genügend lange Zeit ausreichend hohe *b a k t e r i z i d e* Konzentrationen nicht erreicht werden.

Tetrazykline wirken gegen extra- und intrazellulär gelagerte Keime. Vermutlich beruht der Wirkungsmechanismus auf einer Hemmung der Proteinsynthese (GALE, 1960; 1963; HASH und MILLER, 1964).

2.4.4. Diffusion in das Gewebe

Die Diffusion in das Gewebe ist nicht einheitlich. Die höchsten Konzentrationen können in Leber, Niere, Milz und Lunge erwartet werden. In den Knochen findet eine Ablagerung und Speicherung der Tetrazykline statt (MILCH et al., 1957, 1958).

In entzündlichem Gewebe sowie vor allem in Tumorgewebe sind hohe Konzentrationen beobachtet worden (BERK und KANTOR, 1962; KUEMMERLE, 1962 und weitere Autoren).

In der Prostataflüssigkeit sowie in den Geweben von Uterus, Vagina und Tube können ausreichende Mengen nachgewiesen werden (PULASKI und ISOKANE, 1957; GRAF und BERGMANN, 1963; MOSSNER et al., 1965). Beim Menschen sollen Tetrazykline auch durch die Plazenta diffundieren und damit in den fetalen Kreislauf gelangen.

2.4.5. Ausscheidung mit der Milch

Neben der Ausscheidung durch Galle, Kot und Urin soll auch die Ausscheidung durch die Milch erfolgen. Beim Menschen sind dabei bis zu 50 bis 100 % der mütterlichen Serumwerte des Antibiotikums gefunden worden.

Nach REUSSE (1961) dauerte nach intramammärer Applikation von 100 bis 200 mg Aureomycin die Ausscheidung durch die Milch 72 Stunden. Nach 12 Stunden wurden 20 und nach 72 Stunden 0,66 Aureomycin/ml Milch festgestellt. Bei Dosierungen von 400 mg betraf die Ausscheidung einen Zeitraum von über 84 Stunden, wobei nach 12 Stunden 125 , nach 48 Stunden 3,9 und nach 84 Stunden 0,55 Aureomycin pro ml Milch zu ermitteln waren.

OTC ließ sich bis zu 37,3 Stunden in der Milch nachweisen, bei einer Dosis von 400 mg.

Bereits 1953 haben RANDALL et al. darüber berichtet, daß in der Milch unbehandelter Viertel von Kühen die in andere Viertel instillierten Antibiotika nachzuweisen waren. Die Anwesenheit von Aureomycin, bzw. Terramycin war auf die Applikation von 426 mg, bzw. 852 mg der jeweiligen Wirkstoffe zurückzuführen. In den behandelten Vierteln persistierte das Aureomycin 5 Wochen lang, in den unbehandelten Vierteln 5 Tage, im Anschluß an die Applikation der höheren Dosis.

Im Anschluß an die Instillation von OTC war das Antibiotikum in den behandelten Vierteln 3 bis 4 Tage, in den unbehandelten einen Tag lang nachweisbar.

BLOBEL und BURCH (1960) stellten einen Übergang von OTC aus behandelten in unbehandelte Viertel nach einer intramammären Instillation von 426 mg OTC fest. Jedoch waren die in den unbehandelten Vierteln ermittelten Werte stets niedriger als die Blutserumwerte. Sie gingen nicht über 0,08 Einheiten/ml Milch hinaus. Bei Applikation der dop-

pelten Dosis (852 mg) OTC schwankten die Werte in den unbehandelten Vierteln zwischen 0,05 und 0,1 Einheiten/ml Milch.

Die Eliminierung aus den unbehandelten Vierteln und dem Blutserum erfolgte innerhalb 24 Stunden nach der intramammären Applikation von 426 bzw. 852 mg/Viertel.

Im Anschluß an die parenterale Verabreichung von 1 und 2 mg/kg i.m. und die lokale Applikation von 500 und 1000 mg Terramycin i.u. konnten TAYLOR et al. (1964) das Antibiotikum in der Milch nicht nachweisen. Sie schlossen daraus, daß die Blut-Euter-Schranke undurchlässig ist.

HOGH und RASMUSSEN gelang dagegen 1964 der Nachweis von OTC in Milch im Anschluß an die parenterale Verabreichung von 2 bis 4 mg/kg Körpergewicht des Antibiotikums. Ebenso wies 1965 SCHIPPER die Anwesenheit von CTC und OTC nach intravenöser und intramuskulärer Injektion in der Milch nach.

SCHIPPER und EVELETH konnten nach REUSSE (1961) nach i.m. Applikation von 1 g Terramycin an säugende Sauen in den nächsten 24 Stunden bis zu 8 /ml Milch wiederfinden. Auch nach oraler Applikation soll die Ausscheidung von Tetrazyklinen mit der Milch erfolgen. Andere Autoren (ALBRIGHT et al., 1961) sind jedoch von dieser Tatsache nicht überzeugt.

Neben der Ausscheidung der Tetrazyklinpräparate mit der Milch kommt es nach intramammärer Applikation zu einem Reizzustand des Parenchyms. Je nach Art des verwendeten Medikamentes ist dieser mehr oder weniger stark ausgeprägt und kann bis zu 15 Tagen nach der Applikation anhalten (COTT, 1961).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Benutzte Medikamente auf Tetrazyklinbasis

Als intravital angreifende Fluorochrome wurden einige auf dem Markt befindliche Tetrazyklinpräparate benutzt, die in der Mastitis-Therapie Anwendung finden.

3.1.1.1. Tetrazyklin-Suspension ASID (TC)

Dieses Präparat stellt eine wäßrige Zubereitung dar, die Tetrazyklin in Form einer Tetrazyklin-Kalzium-Verbindung enthält, mit 50,17 mg/ml. In seiner Aktivität entspricht 1 ml 50 mg Tetrazyklinhydrochlorid. Das Tetrazyklin-Kalzium in dieser Suspension ist aus der Tetrazyklin-Base hergestellt.

Die Resorption geschieht rasch. Ein wirksamer Blutspiegel ist schon 1 bis 3 Stunden nach parenteraler Applikation vorhanden, und das Tetrazyklin soll sich schnell in alle Körperflüssigkeiten und Gewebe, einschließlich des Euters, verteilen. Die Ausscheidung erfolgt über die Harnwege, den Darm und die Milch. Als Dosis für die Euterbehandlung werden 10 ml/Viertel empfohlen.

3.1.1.2. Celasin-AE-Suspension CELA (OTC)

Bei diesem Präparat liegt eine spritzfertige, ölige Suspension vor, die neben dem Antibiotikum die Vitamine A und E enthält. In 1 ml des Medikamentes sind 50 mg Oxytetrazyklin-HCl, 7000 I.E. Vitamin A und 2 mg Vitamin E enthalten.

Die Anwendung erstreckt sich auf die verschiedensten lokalen Bereiche, unter anderem bei Mastitis, Metritis, Parametritis. Es ist außerdem bei Allgemeininfektionen angezeigt. Die empfohlene Dosis für Euterbehandlungen wird mit 8 ml/Viertel angegeben.

3.1.1.3. Reverin-Suspension HOECHST (PMT)

Hierbei handelt es sich um ein auf partialsynthetischem Wege hergestelltes Antibiotikum der Tetrazyklin-Reihe. In 1 ml Reverin-Suspension sind 55 mg Pyrrolidino-methyl-Tetrazyklin in ölgiger Suspension enthalten.

Nach i.m. Applikation wird das Präparat schnell resorbiert und es entsteht ein hoher Blutspiegel, der nach 24 Stunden noch ausreichende Konzentrationen aufweist.

Die Ausscheidung erfolgt in auffallend hohen Konzentrationen durch den Harn und die Galle, wo nach 24 Stunden höhere Konzentrationen als im Blut nachzuweisen sind. Auch in Pleura- und Peritonealexsudaten sowie Synovia und Liquor ist Reverin in antibiotisch wirksamen Konzentrationen nachweisbar.

Als Dosis in der Mastitis-Therapie werden 10 ml/Euterviertel empfohlen.

3.1.2. Supravitalfluorochromierung mit Acridinorange

Zu Kontrollzwecken wurde die Supravitalfluorochromierung mit Acridinorange (Merck) herangezogen.

Acridinorange (3,6-Tetramethyldiaminoacridin) ist ein basischer Farbstoff, dessen Moleküle - unabhängig von ihrer Konzentration in der Lösung - gelbgrün fluoreszieren. Sein Kation zeigt eine Konzentrationsmetachromasie, die bei niedrigen Konzentrationen Grünfluoreszenz, bei hohen Konzentrationen Rotfluoreszenz bewirkt. Da die Konzentration des Farbstoffes im Gewebe von dessen physikalischen Eigenschaften abhängt, ergeben die verschiedenen Strukturen unterschiedliche Fluoreszenzfarben (EDER, 1966).

Acridinorange wurde in Tyrode-Lösung im Verhältnis 1 : 1000 (0,01 %) gelöst und in verschlossener Flasche dunkel aufbewahrt. Die Tyrode-Lösung wurde in folgender

Weise zubereitet (nach PETERS, persönliche Mitteilung 1970).

Stammlösung I:	NaCl	200,0 g
	KCl	5,0 g
	CaCl ₂	9,8 g
	MgCl ₂	5,1 g
	Aq. dest. ad	1000,0 ml

Stammlösung II:	NaHCO ₃	25,0 g
	Aq. dest. ad	500,0 ml

Stammlösung III:	NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	1,62 g
	Aq. dest. ad	250,0 ml

Vor Gebrauch müssen die Stammlösungen in g e n a u folgender Weise gemischt werden:

Aqua dest.	800 ml
Stammlösung I	40 ml
Stammlösung II	20 ml
Stammlösung III	10 ml
Aqua dest. ad	1000 ml

Puffer wurde nicht zugegeben. Die Lösung hat einen p_H von 7,6.

3.1.3. Apparative Ausstattung

3.1.3.1. Fluoreszenzmikroskop und Zubehör

Es wurde das große Forschungsmikroskop "ORTHOLUX" der Firma LEITZ für Durchlichtuntersuchungen in Verbindung mit der automatischen Mikroskopkamera "ORTHOMAT" benutzt.

Folgende Plan-Apochromat-Objektive kamen zum Einsatz:

10/0.25; 40/0.65 und Oel 100/1.32.

An Okularen fanden Verwendung:

Periplan Okular 8 x (normal und Weitwinkel).

Als Kondensor wurde ein herausklappbarer Hellfeld-Kondensor mit zwei Linsen eingesetzt.

Die Filterkombination bestand aus dem Erregerlichtfilter BG 12 (Schott) 4 mm dick und den Sperrfiltern K 530 oder OG 1.

Als Lichtquelle diente ein Philips CS 150 W Quecksilber-Höchstdruckbrenner mit einem kontinuierlichen und einem Linienspektrum.

3.1.3.2. Hellfeld-Mikroskop

Für Hellfeld-Untersuchungen wurde ein binokulares Mikroskop mit Hellfeld-Kondensor der Firma Leitz vom Typ LABOQLUX benutzt. Die Beurteilung der Präparate erfolgte mit der Oel-Immersion und Periplan-Okularen 8 x.

3.1.3.3. Weitere Geräte

- 1.) Objektträger, zweimal in Äther-Alkohol entfettet und peinlich sauber,
- 2.) Deckgläschen 32 x 24 mm, trocken und staubfrei,
- 3.) Normierte Platinösen mit 0,01 ml Fassungsvermögen,
- 4.) Bunsenbrenner,
- 5.) Schablone für 4 Ausstriche zu je 2 cm²,
- 6.) Sterile Glasröhrchen mit Plastikverschluß zur Milchprobenentnahme,
- 7.) AMP-Röhrchen,
- 8.) Tropfflaschen für Acridinorange,
- 9.) Spritzen und Pipetten.

3.1.4. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Versuchstiere und Patienten der Klinik sowie Reagenten im Rahmen der Untersuchungen durch den Eutergesundheitsdienst herangezogen. Insgesamt sind die Ergebnisse aus Untersuchungen an 73 Tieren berücksichtigt worden.

3.1.5. Auswahl der Tiere und Probenentnahme

Grundsätzlich wurden die allgemeine und spezielle klinische Untersuchung durchgeführt. Im Anschluß an die gründliche Euteruntersuchung erfolgte die makroskopische Beurteilung der Milch in Verbindung mit dem Schalmtest. Nach steriler Probenentnahme von Viertelgemelken Aufbewahrung bei + 4° C für mindestens eine Stunde, an die sich die kulturelle Weiterverarbeitung (Blutplatten) und zytologische Beurteilung anschloß.

Die Hellfeld-Mikroskopie wurde nach der PRESCOTT-BREED-Methode, in der Modifikation von LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961) durchgeführt, wobei die Färbung nach BROADHURST zur Anwendung kam. Mindestens je 10 Gesichtsfelder sind bei 800facher Vergrößerung hinsichtlich Zellgehalt beurteilt worden. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen sind die Versuchsgruppen zusammengestellt worden.

3.1.6. Versuchsgruppen

Für die endgültige Auswertung der Versuche im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Auswahl nach den Untersuchungen gemäß Ziff. 5 wurden die 73 Tiere in 5 Gruppen unterteilt.

Gruppe I umfaßt 9 Tiere mit g e s u n d e n E u - t e r n . Diese Kühe sind mehrere Male intrazisternal und parenteral mit Tetrazyklinen behandelt worden, um den Fluoreszenz-Effekt an den Epithelzellen zu untersuchen, die den größten Anteil somatischer Zellen in der normalen Milch darstellen.

Gruppe II besteht aus 15 Kühen mit S e k r e t i o n s - s t ö r u n g e n . Die Untersuchungen innerhalb dieser Gruppe hatten zum Ziel, die Frage zu klären, ob die verschiedenen Leukozyten differenziert gefärbt werden können.

Gruppe III enthält 7 Kühe mit l a t e n t e r M a - s t i t i s , bzw. Keimbessiedlung. Hierbei sollte ermittelt werden, ob die in relativ geringer Zahl den Strichkanal besiedelnden Bakterien das Tetrazyklin aufnehmen und dargestellt werden können.

Gruppe IV weist 13 Kühe auf, die entweder mit a k u t e r oder s u b a k u t e r M a s t i t i s behaftet sind. Der Effekt nach lokaler und parenteraler Tetrazyklin-Applikation sollte hierbei überprüft werden. Im Zusammenhang damit interessierte speziell die Frage der Leukozytenausscheidung, des Bakteriennachweises und der Phagozytose.

Gruppe V besteht aus 29 Kühen mit c h r o n i s c h e r M a s t i t i s , wobei die graduellen Unterschiede vom milden Verlauf bis zu hochgradiger Zerstörung des Eutergewebes reichen. Bei 5 Tieren dieser Gruppe bestand eine chronische Galactophoritis, die schließlich zum Verlust des betroffenen Euterviertels führte.

3.1.7. Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung

S ä m t l i c h e Viertelproben sind in Form von Nativpräparaten beurteilt worden, einige außerdem nach Stabilisierung und Hitze-fixation, andere auch als Ausstrichpräparate. Alle diese Untersuchungen wurden mit Objektiv 10 x, Okular 8 x (Tubusfaktor 1,25) durchgeführt, um einen allgemeinen Überblick über Zellverteilung und Zellzahl zu erhalten. Die qualitativen Bestimmungen sind mit dem Objektiv 40 x, selten mit der Ölimmersion (100 x) durchgeführt worden.

3.1.7.1. Nativpräparate

Die Nativpräparate wurden sowohl vor als auch nach Fluorochromierung durch Acridinorange untersucht.

Bei der Supravital-Acridinorange-Fluorochromierung wurde nach dem Prinzip der Methode von SCHMIDT MADSEN (1969) vorgegangen. Unwesentliche Modifikationen mußten wegen der vorhandenen Laborbedingungen vorgenommen werden.

Ein AMP-Röhrchen wurde bis Ringmarke 4 (2 ml) mit gut durchmischter Milch gefüllt. Nach Hinzufügen von 4 Tropfen Acridinorange in Tyrode-Lösung 1 : 1000 und vorsichtigem Umschwenken zwecks gründlicher Durchmischung werden 0,01 ml der fluorchromierten Milch auf die eine Hälfte eines Objektträgers aufgebracht und mit einem leicht erwärmten Deckglas bedeckt. Die Erwärmung des Deckglases bewirkt ein besseres Haften.

Auf die andere Objektträgerseite wird die gleiche Menge nicht mit Acridinorange fluorchromierter Milch in gleicher Weise aufgebracht.

Auf diese Weise ist ein rascher Vergleich der Primär- oder durch Tetrazykline induzierten Fluoreszenz gegenüber der durch Acridinorange hervorgerufenen Fluoreszenz leicht möglich.

3.1.7.2. Stabilisierte Proben

Um die Hitzeeinwirkung auf die Fluoreszenzstrahlung der Zellen nach Tetrazyklin-Behandlung zu untersuchen, wurden die Milchproben für die elektronische Zellzählung nach den Angaben von TOLLE (1968) vorbereitet. Nach dem Stabilisieren mit Formaldehydlösung, dem Verdünnen mit dem Elektrolyt-Emulgator-Gemisch und der anschließenden Inkubation bei 80° C sind die solchermaßen entfetteten und verdünnten Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht worden. Wieder wurde 0,01 ml auf einen Objektträger auf-

gebracht, mit einem Deckglas bedeckt wie oben beschrieben. Dadurch, daß die Zellen frei von Fett und Fibrin einzeln gelagert waren, trat die Erscheinung der Fluoreszenz deutlicher auf als bei den Nativpräparaten.

3.1.7.3. Ausstrichpräparate

Aus der gut durchgemischten Milchprobe wird ein dünner Ausstrich angefertigt und luftgetrocknet. Nach dem Entfetten in Xylol (5 Min.) und Fixation in Methanol reinst (3 Min.) läßt man den Ausstrich trocknen. Anschließend einen Tropfen fluoreszenzfreies Immersionsöl auftragen, mit Deckglas bedecken und fluoreszenzmikroskopisch beurteilen. Auch hierbei ist das Zellbild deutlicher als bei den Nativpräparaten, deren Hintergrund oft durch das anwesende Fett undeutlich erscheint.

3.1.8. Vorversuche zur Supravital- und Intravitalfluorochromierung mit Tetrazyklinen

Anhand v o n i n v i t r o durchgeführten Vorversuchen wurde die minimalste Tetrazyklinkonzentration ermittelt, die erforderlich ist, um in kurzer Zeit zelluläre oder bakterielle Fluoreszenz hervorzurufen.

Von den Ausgangs-Suspensionen auf TC-, OTC- und PMT-Basis, die in 1 ml das Äquivalent zu 50 mg Tetrazyklin-HCl aufwiesen, wurde eine Verdünnung mit zellreicher Milch im Verhältnis 1 : 10 (1 ml Suspension + 9 ml Milch) hergestellt. Davon wurde eine Reihenverdünnung mit Milch desselben Ursprungs bis zu 10^{-6} angefertigt. Die erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurde nach 30 Minuten durchgeführt, dann in stündlichen Intervallen. Zwischendurch wurde die Milch-Tetrazyklin-Mischung gut durchgeschüttelt.

Es wurde bei diesen Vorversuchen festgestellt, daß das Terramycin von PFIZER die Zellen n i c h t anfärbt.

Es waren lediglich Osazon-ähnliche Kristalle mit hellgelber Fluoreszenz zu ermitteln. Aus diesem Grunde wurde das Präparat aus der Versuchsreihe eliminiert.

TC, OTC und PMT zeigten intensive Primärfluoreszenz bis zur Verdünnung von 10^{-3} während der ersten 3 Stunden. Danach fluoreszierten die Zellen deutlich. Nach 3 Stunden war bei einer Verdünnung von 10^{-4} die Zellfluoreszenz gegenüber der Primärfluoreszenz deutlich, und nach 6 Stunden war das meiste Tetrazyklin von den Zellen absorbiert.

Bei Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} wurde nach 3 Stunden keine Fluoreszenz beobachtet, obwohl während der ersten beiden Stunden eine minimale Autofluoreszenz zu erkennen war.

Bei den Vorversuchen *in vivo* wurde festgestellt, daß Terramycin-Suspension auch nach 24 Stunden die Zellen nicht anfärbt. Es war nach intramammärer Applikation lediglich eine intensiv gelbe Primärfluoreszenz festzustellen. Wie oben bereits erwähnt, wurde das Präparat daher nicht weiter für Versuche eingesetzt.

Acridinorange wurde für sich oder in Kombination mit Tetrazyklin-Präparaten benutzt. Es wurden sehr niedrige Konzentrationen bis 1 : 100 000 verwendet, jedoch resultierten daraus zu große Gewebsschädigungen.

Ein weiteres Präparat - üblicherweise gegen Filarien gerichtet - mußte ebenfalls ausgeklammert werden, da es die Kerne der Zellen in Gegenwart von Tetrazyklinen nicht anfärbt. Es handelte sich um das Präparat 33258 von HOECHST [γ -2-(2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl)-6(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol-tri-hydrochlorid], das von LÄMMLER und SCHUTZE (1969) als Vital-Fluorochrom erwähnt worden ist.

3.1.9. Hauptversuche zur Intravitalfluorochromierung mit Tetrazyklinen

3.1.9.1. Verabreichung und Dosierung

Die Tetrazyklin-Suspensionen wurden entweder durch Instillation in die Zitzenzisterne, intramuskulär, intravenös oder kombiniert lokal und parenteral appliziert.

Die Dosis für die lokale Anwendung entsprach für TC und PMT dem Äquivalent von 500 mg TC-Hydrochlorid, für OTC dem von 400 oder 500 mg. In einigen Fällen wurde die Hälfte oder die doppelte Menge appliziert.

Bei der parenteralen Behandlung lag die Dosis bei:

0,06 ml/kg für TC

2,0 ml/50 kg (oder 4,0 ml/50 kg) für OTC und

2,0 ml/50 kg für PMT

3.1.9.2. Probenentnahme

Anfangsgemelke wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen. In Gruppe I erfolgte die Entnahme nach der Behandlung in folgenden Intervallen: 3, 6, 16, 24, 36 oder 48 Stunden, in den anderen Gruppen hauptsächlich nach 6, 16 und 24 Stunden. In einigen Fällen wurden Proben bis zu 72 Stunden nach der Tetrazyklin-Applikation entnommen, in Abhängigkeit von den Ergebnissen aus den vorher gewonnenen Milchproben. Gelegentlich wurden auch Endgemelke untersucht. Im wesentlichen wurden die Versuche jedoch nach 24 Stunden als beendet angesehen.

Blutproben wurden in Abständen von 1/2, 1, 3, 6 und 12 Stunden nach der parenteralen Verabreichung entnommen und als Nativ- oder Ausstrichpräparate untersucht.

3.2. Versuchsablauf und Ergebnisse

3.2.1. Gruppe I (Kühe mit gesunden Eutern)

Die erste Gruppe umfaßt 9 Kühe mit g e s u n d e n Eutern und einer Tagesleistung von 9 bis 20 l Milch. Das Alter der Tiere lag zwischen 3 und 8 Jahren, die Laktationsstadien betrafen bei:

- 1 Kuh die Kolostralphase,
- 7 Kühen den Höhepunkt der Laktation und
- 1 Kuh das Altmelkstadium.

An dieser Gruppe sollte festgestellt werden, ob Tetrazykline in der Lage sind, eine Fluoreszenz der Epithelzellen zu induzieren, da diese Zellart den prozentual größten Anteil der Zellen in normaler Milch darstellt. Ferner sollte das Fluoreszenzverhalten der Kolostralkörperchen nach lokaler und/oder parenteraler Tetrazyklin-Applikation geprüft werden.

Alle Tiere erhielten die Antibiotica lokal in jeweils zwei Euterviertel, wie in Tabelle 1 angegeben. Die Untersuchung von Proben aus allen vier Vierteln wurde bis auf 72 Stunden nach der Verabreichung der Tetrazykline ausgedehnt.

Nach einer Ruhepause von 7 Tagen erhielten alle Kühe die jeweils vorher lokal applizierten Präparate intramuskulär, wobei TC in Dosierungen von 1 bis 3 g, OTC von 2 und 4 g und PMT von 2 und 3 g verabfolgt wurden. Nach 3, 6, 12 und 24 Stunden wurden dann Viertelmilchproben entnommen und untersucht.

Nach einem weiteren 7tägigen Intervall erhielten sämtliche Tiere TC intravenös (2 bis 3 g). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurde bis auf 24 Stunden ausgedehnt.

Blutproben wurden im Anschluß an die parenteralen Verabreichungen nach 1/2, 1, 3, 6 und 12 Stunden untersucht.

E r g e b n i s s e :

Nach 3 und 6 Stunden zeigten die Milchproben aller behandelten Viertel eine intensive gelbe Primärfluoreszenz der Tetrazykline.

Bei niedriger Dosierung (5 ml TC und PMT, entsprechend 250 mg, bzw. 4 ml OTC, entsprechend 200 mg) waren Zellkonturen nach 3 Stunden schwach zu erkennen, sie wurden deutlicher nach 6 Stunden. Nach 16 Stunden war keine durch Tetrazyklin bedingte Autofluoreszenz mehr zu erkennen, außer in den Vierteln, in die die doppelte empfohlene Dosis, d.h. 16 bis 20 ml, entsprechend 800 bis 1000 mg, instilliert worden war. Die gleiche Erscheinung war bei einem Tier mit relativ niedriger Tagesleistung (9 Liter) zu beobachten, wo die Autofluoreszenz sogar bis zu 24 Stunden anhielt.

In den unbehandelten Vierteln wurde überhaupt keine Zellfluoreszenz beobachtet. Auch nach abschließend parenteraler Behandlung (i.m. und i.v.) trat keine Fluoreszenz auf. Die Proben zeigten lediglich eine allgemeine blauweiße bis gelbgrüne Fluoreszenz, die bei Fortdauer der Erregerlichtstrahlung nachließ.

Nativpräparate und Ausstriche aus dem Blut zeigten keinerlei Fluoreszenzerscheinungen nach der Antibiotika-Behandlung.

Z e l l b i l d :

a) Höhepunkt der Laktation und Altmelkstadium

Sechs Stunden nach intrazisternaler Applikation waren hauptsächlich große, unregelmäßig geformte Zellen und ovale oder spindelförmige Zellen zu ermitteln. Erstgenannte waren entweder flach oder gefaltet, mitunter auch faltig. Ihre Größe betrug 25 bis 37 μ , bei den faltigen Zellen be-

trug die Länge durchschnittlich 22 μ . Nach 16 Stunden traten runde Zellen mit einem Durchmesser von 8 bis 13 μ auf. Wie in Tabelle 1 dargestellt, betrug die längste Zeit für eine erkennbare Zellfluoreszenz 48 Stunden und zwar in den Fällen, in denen 1000 mg TC, bzw. PMT instilliert worden waren. Nach 16 Stunden war die Fluoreszenz am besten, nach 24 Stunden häufig noch deutlich genug, jedoch schwach ausgeprägt nach 36 bis 48 Stunden.

Alle zellulären Elemente zeigten anfangs schwache Fluoreszenz und erschienen grünlichgelb. Nach 15 bis 20 Sekunden dauernder Anregung nahm die Fluoreszenz in fortschreitendem Maße zu, und die Zellen zeigten eine gelbe bis gelblich-braune Fluoreszenz.

Die flachen Zellen wiesen die schwächste Fluoreszenz auf. Sobald sie die gefaltete oder sogar faltige Form annahmen, fluoreszierten ihre Konturen heller und klarer, während die Intensität innerhalb der Zellen entsprechend variierte. Die Ränder fluoreszierten hellgrün, bei Überlappung grünlich-gelb, und der Rest des Zytoplasmas bräunlich.

Im Zytoplasma von einigen der ovalen oder spindelförmigen Zellen gab es weißgelbe granulierte Bezirke.

Die runden Zellen, durch Acridinorange als Leukozyten identifiziert, emittierten eine hellere goldgelbe Fluoreszenz, zeigten jedoch keine Differenzierung von Plasma und Kern. Nach Erregerlicht-Exposition von einer Minute trat ein strangartiges Netzwerk in Erscheinung, und im Plasma wurden dunkle Bezirke deutlich. Diese Bezirke erwiesen sich als Zellkerne, wenn man Acridinorange an einer Seite des Deckglases auf den Objektträger gab. Durch die Kapillarströmung drang die Lösung in das Präparat unter dem Deckglas ein und ermöglichte so die Supravitalfluorochromierung. Dadurch konnten die Kerne dargestellt werden, die dann leuchtend gelbgrün fluoreszierten.

Endgemelke wiesen einen größeren Anteil ovaler Zellen auf. In einigen Fällen war die Fluoreszenz ausgeprägter als bei den Anfangsgemelken. Die in diesen Zellen mit Acridinorange nachweisbaren Fettröpfchen waren durch Tetrazykline nicht darstellbar.

b) Kolostralphase

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Zelltypen enthält Kolostralmilch ovale oder runde Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 36 μ . Das Zytoplasma dieser Zellen fluoresziert polychromatisch. Während einige gleichmäßig gelb fluoreszieren, zeigen andere ungleichmäßig verteilte gelbbraune Einschlüsse, und in wieder anderen waren weißgelbe Granula vorhanden.

Mit Acridinorange fluoreszieren diese Einschlusskörperchen orangefarben bis rötlich.

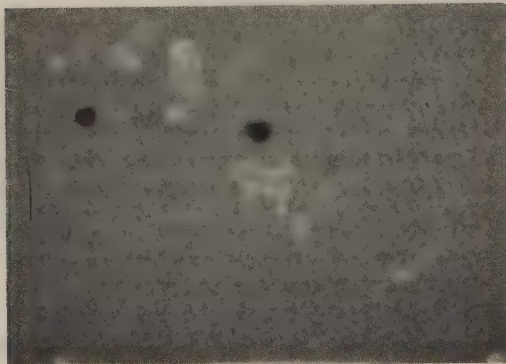
In 14 der 18 behandelten Euterviertel konnte eine Zunahme von einem Viertel bis zu einem Drittel des Zellgehaltes 16 Stunden nach der Behandlung mit Tetrazyklinen beobachtet werden als Zeichen für eine Reizwirkung auf die Milchdrüse.

Die Gegenfluorochromierung mit Acridinorange erbrachte den Beweis, daß es sich bei den großen Zellen um squamöse Epithelien und bei den spindelförmigen Zellen um Zylinderepithelien handelte. Einige der ovalen Zellen erwiesen sich als kubisches Epithel. Bei den kleinen runden Zellen mit 8 bis 13 μ Durchmesser handelte es sich um Leukozyten. Die großen Zellen mit den vielfarbigen Einschlüssen erwiesen sich als Kolostralkörperchen.

Da Tetrazykline den Kern nicht anfärben, war die Zelldifferenzierung limitiert und nur möglich aufgrund der Größe, Gestalt und Form.

Die Zellfluoreszenz durch TC war stärker ausgeprägt als diejenige durch OTC und PMT (Abb. 1).

Abbildung 1



Zellbild der Milch von einer Kuh mit gesundem Euter, 16 Stunden nach Tetrazyklin-Applikation (TC). Eine Epithelzelle und mehrere Leukozyten sind dargestellt.

3.2.2. Gruppe II (Sekretionsstörungen)

Diese Gruppe umfaßt insgesamt 15 Kühe mit S e k r e -
t i o n s s t ö r u n g e n , wobei sich

- 5 Tiere in der Kolostralphase,
- 7 Tiere auf dem Höhepunkt der Laktation und
- 3 Tiere im Altmelkstadium befanden.

Im Zusammenhang mit der Sekretionsstörung lagen folgende Prozesse vor:

- Milchabflußstörung bei 4 Kühen,
- Zitzenverletzungen bei 8 Kühen,
- verschiedene Ursachen bei den restlichen 3 Kühen.

Keimwachstum konnte weder durch die bakterioskopische Untersuchung im Direktausstrich, noch durch die kulturelle Untersuchung festgestellt werden.

In Tabelle 2 sind die zytologischen Befunde anhand der nach BROADHURST gefärbten Direktausstriche und der mit Acridinorange fluorchromierten Nativpräparate zusammengefaßt.

Die Untersuchungen sollten die Frage klären, ob Tetrazykline eine Fluoreszenz der Leukozyten induzieren sowie unterschiedliche Fluoreszenz von Kernen und Zytoplasma bewirken. Ferner sollte festgestellt werden, ob durch dieses Verfahren eine Abgrenzung der Zellkerne und des Protoplasmas voneinander sowie von Epithelzellen oder Kolostralkörperchen möglich ist. Gleichzeitig wurde die Dauer der in vivo erzeugten Fluoreszenz über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt.

Die Menge der applizierten Tetrazykline entsprach dem Äquivalent von 500 mg Tetrazyklin-HCl, bzw. der doppelten Menge.

Gleichzeitig wurden Milchproben unbehandelter Euterviertel untersucht um festzustellen, ob bei Anwendung dieser Dosierungen die Schranke zwischen den Vierteln durchbrochen wird, um eine Fluoreszenz der Zellen auch in den unbehandelten Vierteln zu bewirken. Vier Kühe (Nr. 10, 12, 14 und 15) erhielten zusätzlich zur lokalen Antibiotika-Versorgung an einem Tage zweimal 30,0 ml Tetrazyklin (TC) intravenös, insgesamt also 3 g.

Die Probenentnahme erfolgte 6, 16, 24, 36 und 48 Stunden nach der Behandlung.

E r g e b n i s s e :

Alle behandelten Viertel zeigten primäre Tetrazyklinfluoreszenz innerhalb der ersten 6 Stunden und fast

gar keine Autofluoreszenz nach 16 Stunden. S e k u n -
d ä r e Zellfluoreszenz war nach 6 Stunden deutlich er-
kennbar, jedoch war der größere Anteil der Zellen durch
die Primärfluoreszenz gekennzeichnet.

Die stärkste Z e l l f l u o r e s z e n z war nach
16 Stunden zu beobachten. Sie war nach 24 Stunden noch
deutlich und schwach nach 36 Stunden sichtbar. In den Fäl-
len Nr. 11, 12, 15, 19 und 22 hielt die zelluläre Fluores-
zenz bis zu 48 Stunden an, war jedoch nur sehr schwach
ausgeprägt, und die Zellen waren nach verlängerter Erre-
gerlichtexposition bis zu 10 Minuten nur schwach zu er-
kennen.

Z e l l b i l d

Kolostralphase:

Die Proben der Kühe Nr. 11, 12, 18 und 23 zeigten unge-
fähr die gleiche Fluoreszenzintensität nach TC, OTC und
PMT. Das charakteristische Bild aller Proben betraf die
großen Variationen hinsichtlich der Zellgröße, sowie der
Metachromasie der Kolostralkörperchen.

Die Kolostralkörperchen sind große Gebilde von 27 bis
37 μ Durchmesser, die anfangs gleichmäßig grünlichgelb
fluoreszieren. Mit fortdauernder Strahlung traten viel-
farbige "Einschlußkörperchen" auf, die innerhalb des Zy-
toplasmas gelblichbraun bis rötlich gefärbt zu erkennen
waren und der Zelle ein buntes, vakuolisiertes Aussehen
gaben. Es wurde keine Kernfluoreszenz beobachtet, jedoch
waren dunkle Bezirke, durch gelbe Stränge miteinander ver-
bunden, wahrnehmbar.

Etwas ovale, flache Zellen bildeten etwa 30 % der Gesamt-
zahl. Diese Zellen waren ähnlich wie die Epithelzellen
in der Gruppe I beschaffen. Sie konnten von den Kolostral-
körperchen durch das Fehlen der Metachromasie innerhalb
ihres Zytoplasmas abgegrenzt werden. Die Fluoreszenzer-

scheinungen waren mehr grünlichbraun, und der Zelldurchmesser betrug 20 bis 31 μ .

Zirka 50 % der Zellen waren rund und zeigten gelbe bis goldgelbe Fluoreszenz. Kernfärbung bestand nicht; einige Zellen wiesen körnige Zytoplasmafluoreszenz auf, während andere ein strangartiges Netzwerk erkennen ließen, das in einigen dunkel erscheinenden Bezirken des Zytoplasmas vorlag. Wieder andere Zellen wiesen einen deutlichen dunklen Bereich auf, meist zentral gelagert und kernähnlich. Diese runden Zellen hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 10 μ . Durch Gegenfluorochromierung mit Acridinorange konnten sie als Leukozyten identifiziert werden.

Höhepunkt der Laktation:

Durchschnittlich entfielen 70 % der Zellen auf die Leukozyten. Wegen der großen Leukozytenzahl war nach 16 Stunden eine helle, blaßgelbe Fluoreszenz innerhalb einer Bestrahlungszeit von 15 Sekunden zu beobachten. Die Zellen waren größtenteils rund oder oval und zeigten Durchmesser zwischen 7,5 und 13 μ . Mit verlängerter Bestrahlung erhalten sie eine goldgelbe Farbe, die nach und nach in Braun übergeht. Dunkle Bezirke von unterschiedlicher Größe und Zahl zeichneten sich ab und gaben den Zellen ein vakuolisiertes Aussehen (Abb. 2 und 4). Noch nach 15 Minuten dauernder Bestrahlung war starke Fluoreszenz vorhanden.

Die größeren ovalen oder oft auch zylindrischen Zellstrukturen wiesen annähernd die gleichen Charakteristika auf wie die Leukozyten. Selten konnten faltige oder gefaltete große Zellen gefunden werden, die grüngelbe Fluoreszenz zeigten.

Wie auch bei Gruppe I zeigten die Milchproben unbehandelter Euterviertel nur eine allgemeine, unspezifische Eigenfluoreszenz vor und nach parenteraler Tetrazyklin-Applikation. Da sich der Kern nicht färbte, war die Ab-

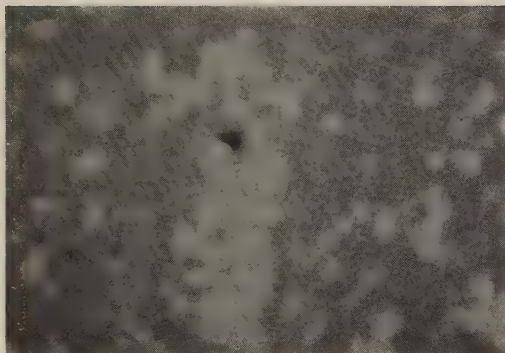
grenzung von den Leukozyten unmöglich. Mitunter ließen die dunklen Bezirke innerhalb des Zytoplasmas wegen ihrer Form die Annahme zu, daß es sich um Segmentierungen handeln könnte. Ein maschenartiges aus Strängen bestehendes Netzwerk führte jedoch zur Entstehung weiterer dunkler Bezirke, wodurch die Interpretation, daß es sich bei den erstgenannten Zellen um segmentkernige Leukozyten handeln könne, höchst zweifelhaft erscheint.

Altmelkstadium:

Hier stellen die Leukozyten mit ca. 60 % den größten Anteil an Zellen. Bei Kuh Nr. 22 mit Stenose der Zitzenzisterne waren Leukozyten und Epithelzellen in etwa gleicher Menge vorhanden. In einem anderen Fall (Nr. 10) konnten 4 Tage vor dem Trockenstellen einige Kolostralkörperchen nachgewiesen werden. Die Metachromasie war bereits angedeutet, jedoch noch nicht so ausgeprägt wie bei echter Kolostralmilch nach dem Kalben.

Die Fluoreszenzerscheinungen der Leukozyten und Epithelzellen waren denjenigen während der Höhe der Laktation sehr ähnlich.

Abbildung 2



Nativpräparat aus der Milch einer Kuh mit S e k r e -
t i o n s s t ö r u n g (Milchabflußstörung) 16 Stunden
nach OTC-Applikation.

Zahlreiche L e u k o z y t e n fluoreszieren als runde
und ovale g e l b e Gebilde.

3.2.3. Gruppe III (latente Mastitis und Besiedlung)

In dieser Gruppe sind 7 Kühe mit l a t e n t e r
M a s t i t i s berücksichtigt worden, die sich in ver-
schiedensten Laktationsstadien befanden.

Es waren:

- 1 Kuh in der Kolostralphase,
- 5 Kühe auf der Höhe der Laktation und
- 1 Kuh im Altmelkstadium.

Die hier berücksichtigten Viertelmilchproben wiesen keine
wahrnehmbaren Veränderungen auf. Wie in Tabelle 3 darge-
stellt, konnten Keime angezüchtet werden, ausgenommen

in drei Fällen (Nr. 27, 30 und 31), in denen jedoch mikroskopisch Bakterien festgestellt wurden.

Ziel der Untersuchungen war hier festzustellen, ob in geringer Anzahl vorhandene Bakterien aus klinisch unveränderter Milch in der Lage sind, Tetrazyklin aufzunehmen und Fluoreszenz zu zeigen.

Die applizierten Mengen entsprachen den für die Mastitis-Behandlung empfohlenen Dosierungsvorschriften. Vier Kühen (Nr. 26, 27, 30 und 31) wurde zusätzlich zur lokalen Behandlung Tetrazyklin an zwei Tagen intramuskulär verabfolgt. In diesen Fällen sind Milchproben nach 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden untersucht worden.

Proben aus lokal behandelten Eutervierteln sind nur nach 16 und 24 Stunden entnommen worden, um zu vermeiden, daß die Interferenz mit tetrazyklinbedingter Primärfluoreszenz zu fälschlichen Interpretationen führt. Diese Primärfluoreszenz ist eine typische Erscheinung innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Applikation.

Jedes Nativpräparat ist vor der Untersuchung und Bewertung mindestens zwei Minuten lang der Erregerlichtstrahlung ausgesetzt worden, um eine ausreichende Fluoreszenz für differentialdiagnostische Zwecke zu erhalten. Es wurden mindestens 50 Gesichtsfelder beurteilt.

E r g e b n i s s e :

In sämtlichen lokal behandelten Vierteln war die Zellfluoreszenz ähnlich derjenigen in Gruppe I. Eine homogene, grünlich-blaue Primärfluoreszenz war lediglich in unbehandelten Vierteln zu beobachten. Die Bakterien leuchteten von grünlich-gelb bis hell goldgelb, mitunter waren sie auch als bräunlich getönte, kleine rundliche und aktiv bewegliche Körper zu erkennen. In zwei Fällen konnten keine Bakterien beobachtet werden (Nr. 27 und 29); in einem weiteren

Fall (Nr. 25, HR) waren nach 16 Stunden noch keine Bakterien zu ermitteln, jedoch nach 24 Stunden waren sie darstellbar.

Die Intensität war nach 24 Stunden schwächer als nach 16 Stunden. Obwohl eine gewisse Zellfluoreszenz in einigen Fällen noch nach 36 Stunden vorhanden war, konnten zu diesem Zeitpunkt keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.

In einer Probe (25, vR) waren pleomorphe Bakterien zu finden. Die meisten Bakterien erschienen jedoch als runde oder kokkenähnliche Gebilde, teils einzeln liegend, teils in kurzen drei- bis viergliedrigen Ketten vorkommend. In einem Fall zeigte die viergliedrige Kette goldgelbe Fluoreszenz mit stärkerer Intensität an der Peripherie und deutlicher Demarkation. Ebenfalls angetroffene ovale Formen und Stäbchen wiesen eine mehr granulierte Fluoreszenz auf, die sich auf die endständigen Pole konzentrierte, während das Zentrum nur schwach fluoreszierte oder dunkel blieb. Dasselbe Bild erhielt man bei Ausstrichpräparaten. Der Pleomorphismus konnte durch die Supravitalfärbung mit Acridinorange bestätigt werden. Die meisten Keime erschienen als rötlich getönte Organismen. Die ovoiden und stäbchenförmigen Organismen mit der polaren Affinität zu den Tetrazyklinen schienen E. coli und Pasteurellen zu sein.

Im Gegensatz zur Gramfärbung scheint eine differenzierte Fluoreszenz nicht vorzuliegen, lediglich die Formen waren eindeutig voneinander zu unterscheiden.

In keinem der Fälle waren intrazellulär gelegene Bakterien zu ermitteln.

Proben von Kühen, denen Tetrazykline intramuskulär verabreicht worden waren, zeigten weder eine zelluläre Fluoreszenz, noch eine solche der Bakterien. Es war jedoch eine allgemeine, schwach grünblaue Fluoreszenz zu erkennen (Tab. 4).

Das läßt die Annahme zu, daß die Ausscheidung dieser Antibiotika durch die Milch in so geringen Konzentrationen erfolgt, daß keine ausreichenden Mengen von den Zellen und Bakterien absorbiert werden können, um Fluoreszenzerscheinungen zu erzeugen. Weiterhin kann angenommen werden, daß der direkte Kontakt des Antibiotikums mit der Milch erforderlich ist, um Fluoreszenzerscheinungen auszulösen.

3.2.4. Gruppe IV (akute und subakute Mastitis)

In dieser Gruppe fanden 13 Kühe mit akuten odersubakuten Mastitiden Berücksichtigung. Beurteilt wurden die durch Tetrazykline ausgelösten Fluoreszenzeffekte an den Zellen, extra- und intrazellulär gelegenen Bakterien sowie beim Vorliegen von Phagozytose.

Die Kühe befanden sich wiederum in verschiedenen Laktationsphasen und zwar waren:

- 4 Kühe in der Kolostralphase,
- 6 Kühe auf dem Höhepunkt der Laktation und
- 3 Kühe im Altmelkstadium.

Bei 10 Kühen bestand eine fieberhafte Toxaemie mit Körpertemperaturen zwischen 39,7 und 41,5° C. In diesen Fällen wurden die Tetrazykline lokal und parenteral verabreicht (Tab. 5), während bei den drei übrigen Tieren (Nr. 33, 34 und 36) lediglich die intrazisternale Applikation erfolgte.

Die Dosierung erfolgte nach den Empfehlungen der Herstellerfirmen, bzw. teilweise in der doppelten Höhe.

Die Probenentnahmen fanden 16 und 24 Stunden nach der Behandlung statt, in einigen Fällen nochmals nach 72 Stunden. Bei der trockengestellten Kuh Nr. 34 wurden nur nach 72 Stunden Viertelproben entnommen.

E r g e b n i s s e :

Die Milchproben aus den behandelten Vierteln zeigten nach 16 und 24 Stunden im allgemeinen keine primäre Tetrazyklinfluoreszenz. Eine Ausnahme bildeten die Kühe Nr. 32, 34, 37, 41 und 44, bei denen die Milchleistung der betroffenen Euterviertel enorm zurückgegangen war. Aus dieser Abnahme der Milchmenge dürfte sich auch die Aufrechterhaltung der durch Tetrazykline bedingten Primärfluoreszenz erklären.

Zellfluoreszenz war in Proben unbehandelter Viertel nicht nachzuweisen, auch nicht nach parenteraler Applikation.

Fluoreszenz in behandelten Vierteln

Alle Proben zeigten nach 16 bis 24 Stunden intensive Zellfluoreszenz. Die nach 72 Stunden entnommenen Proben von Kuh 34 wiesen eine gleich starke Fluoreszenz auf und verdeutlichten so, daß der periodische Milchentzug zu den Melkzeiten die für eine Zellfluoreszenz durch Tetrazykline erforderliche Antibiotikamenge mit sich führt.

In überwiegendem Maße waren die kleinen runden oder ovalen Zellen mit goldgelber Fluoreszenz innerhalb minimaler Erregerlichtbestrahlung zu finden. Sie traten meist flächenhaft auf, durch grüngelb oder gelblichbraun fluoreszierende Fibrinstränge miteinander verbunden.

Bei den Kolostralkörperchen war die charakteristische Metachromasie zu beobachten, wie sie bereits bei den Gruppen I und II beschrieben worden ist. 90 % der Zellen wiesen extrazellulär oder intrazellulär gelagerte Bakterien auf. Die extrazellulär gelegenen Bakterien zeigten entweder kokkenförmige Gestalt oder waren pleomorph und traten sowohl einzeln als auch in Ketten auf. Bei den Kühen Nr. 32, 38 und 39 waren Kokken und Stäbchen vorhanden.

Die Bakterien erschienen ursprünglich blaß- oder grünlichgelb, um nach 30 Sekunden einen hellen, glatt goldgelben

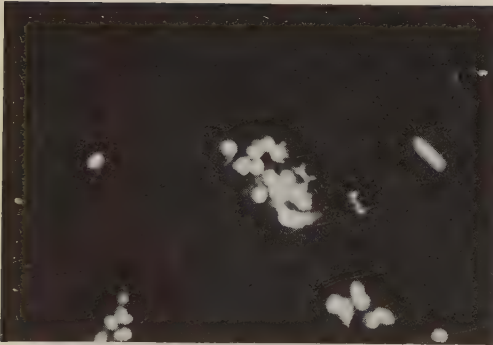
Ton zu erhalten. Von der granulären, primären Tetrazyklin-fluoreszenz konnten sie unterschieden werden durch ihre aktive Beweglichkeit einerseits und durch ihre Form sowie andererseits durch ihre Fluoreszenzstrahlung. Während die Tetrazyklin-Granula ein scharfes reflektierendes Fluoreszenzlicht emittieren, ist bei den Bakterien eine mehr oder weniger gleichmäßige Emission eines dunkler gelben Tones anzutreffen.

Ketten mit bis zu 8 Gliedern waren in den Proben der Kühe Nr. 32, 38 und 40 zu finden.

Die Anwesenheit pleomorpher Bakterien, bestehend aus gelb fluoreszierenden kurzen oder langen Stäbchen und ovalen Körpern, konnte durch die kulturelle Untersuchung, Gramfärbung und Fluorochromierung mit Acridinorange immer als Befall mit Corynebakterien identifiziert werden. Wegen ihres Vorkommens in großer Anzahl waren sie leicht zu diagnostizieren.

Etwa 10 % der runden Zellen (Leukozyten) hatten in ihrem Zytoplasma gelb fluoreszierende Einschlüsse aufzuweisen. Die Zahl der meist runden Einschlüsse bewegte sich zwischen 3 und - in einigen Fällen - über 10 pro Zelle. Sie kontrastierten gegenüber den zytoplasmatischen Strängen durch ihre solidere Erscheinung. In einigen Fällen schienen sie vom Zytoplasma "ummauert" zu sein und erwiesen sich durch Acridinorange als phagozytierte Keime.

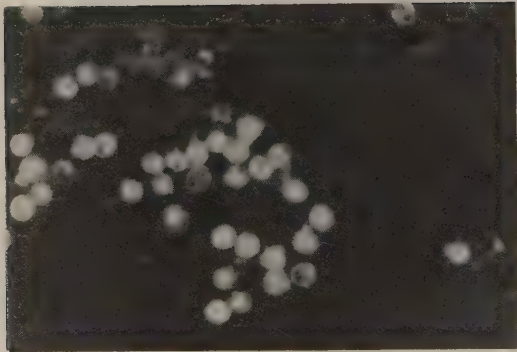
Abbildung 3



Zellbild (Nativpräparat) einer Kuh mit akuter Mastitis vor der Behandlung nach Supravitalfluorochromierung mit Acridinorange.

Leukozyten, Lymphozyten und Ketten von Streptokokken.

Abbildung 4



Nativpräparat aus der Milch derselben Kuh wie in Abb. 3,
16 Stunden nach Intravitalfluorochro-
mierung mit PMT.
Das strangartige Netzwerk ist in den Leu-
kozyten sichtbar.

Abbildung 5



Milch einer Kuh mit s u b a k u t e r M a s t i -
t i s .

Leukozyten, extrazellulär und intrazellulär gelagerte
Bakterien 28 Stunden nach Intravitalfluorochromierung
mit TC. (Diese Probe zeigte noch nach dreiwöchiger Auf-
bewahrung bei + 4° C starke Fluoreszenz.)

Abbildung 6



Die gleiche Probe wie in Abb. 5, jedoch nach S u p r a -
v i t a l f l u o r o c h r o m i e r u n g mit
A c r i d i n o r a n g e .

3.2.5. Gruppe V (chronische Mastitis)

In dieser Gruppe sind Kühe mit chronischen Mastitiden berücksichtigt worden. Einige zeigten keinerlei klinische Veränderungen, weder das Eutergewebe noch die Milch betreffend. Andere Tiere hingegen wiesen unterschiedliche Grade von Gewebeschädigungen des Euters auf. Die betroffenen Viertel waren hart, knotig oder induriert, und einige Milchproben enthielten Flocken oder Fibrin, bzw. sogar nekrotisches Material.

Zytologisch war bei allen betroffenen Eutervierteln eine Erhöhung des Zellgehaltes der Milch festzustellen. In einigen Ausstrichen sowie kulturell konnten verschiedene Keimarten nachgewiesen werden, hauptsächlich Streptokokken, Staphylokokken und Mikrokokken.

Die hier berücksichtigten Tiere sind in zwei Untergruppen aufgeteilt worden. In der ersten Untergruppe sollte bestimmt werden, wie sich die zelligen Elemente in der Milch nach Tetrazyklin-Applikation verhalten. Anhand der zweiten Untergruppe sollten Informationen darüber gewonnen werden ob:

- I) nekrotisches Gewebe und Zelltrümmer eine durch Tetrazykline induzierte Zellfluoreszenz simulieren können und dadurch falsche Ergebnisse zeitigen,
- II) Zellfluoreszenz durch Chloramphenicol, Penicillin und Streptomycin ausgelöst werden kann.

Untergruppe V_a

Für die Untersuchungen über das Verhalten der zellulären Elemente der Milch nach Tetrazyklinapplikation wurden insgesamt 18 Kühe ausgewählt, die sich teils auf der Höhe der Laktation, teils im Altmelkstadium befanden. Bei all diesen Kühen waren keinerlei klinische Abnormitäten festzu-

stellen, jedoch war der Zellgehalt erhöht und es wurden Bakterien mit der Milch ausgeschieden. Die durchschnittliche Milchleistung betrug 15 Liter pro Tag.

Die Tetrazyklinbehandlung erfolgte lokal nach dem morgendlichen Melken. Am Nachmittag des Behandlungstages wurden die Kühe nicht gemolken. Die Milchprobenentnahme fand 24 Stunden nach der Behandlung statt. Die Bestimmung des Zellgehaltes sämtlicher Proben erfolgte durch die AMP (DDH-Test), gefolgt von der nativen Fluoreszenzmikroskopie und der Beurteilung nach Supravitalfluorochromierung mittels Acridinorange.

E r g e b n i s s e :

Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse ist in Tabelle 6 wiedergegeben. Bei allen Proben war ein erhöhter Zellgehalt zu verzeichnen, gemäß den Ergebnissen mittels AMP und Acridinorange-Fluorochromierung. Die AMP-Werte zwischen 5,5 und 8,0 zeigen Zellgehalte von 500 000 bis zu einer Million/ml Milch und darüber an.

Die Acridinorange-Fluorochromierung erbrachte im Durchschnitt eine Zelldichte von wenigstens 10 Zellen/Gesichtsfeld, in 25 % der Proben betrug die durchschnittliche Zellzahl mehr als 80 Zellen/Gesichtsfeld (Objektiv 10 x). Normale Milch enthält bei dieser Vergrößerung durchschnittlich 5 Zellen pro Gesichtsfeld.

Primäre Tetrazyklinfluoreszenz war bei 25 % der Viertel festzustellen, 33 % erbrachten Zellzahlen von weniger als 10/Gesichtsfeld mit schwacher Tetrazyklinfluoreszenz, und der Rest enthielt 20 bis 30 Zellen/Gesichtsfeld bei großer Intensität.

Proben mit hohem Zellgehalt, die eine stark ausgeprägte, durch Tetrazyklin induzierte Fluoreszenzintensität der Zellen aufwiesen, bereiteten Schwierigkeiten bei der Zelldifferenzierung mit Acridinorange. Diese Zellen waren nicht

in der Lage, das Acridinorange gut aufzunehmen und zeigten somit, daß es zu einer Interferenz zwischen Tetrazyklinanlagerung und Acridinorange-Absorption kommen kann (Abb. 7).

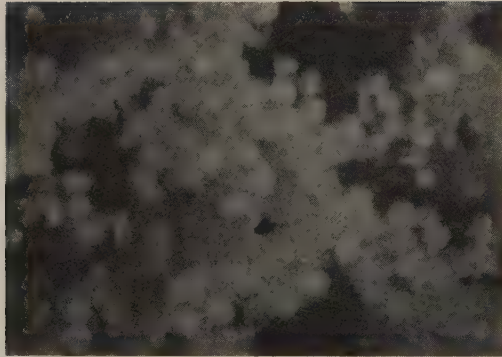
Mittels Tetrazyklin gestaltete sich die Zelldifferenzierung schwierig. Sie ist nur verhältnismäßig grob möglich und basiert hauptsächlich auf der Größe der Zellen, in geringerem Umfang auf der Beurteilung ihrer Formen. Die Leukozyten erschienen rund, mit geringgradigen Abweichungen bezüglich ihrer Größe. Einige der kubischen Zellen konnten leicht in die Gruppe der Leukozyten einbezogen werden. Es ist anzunehmen, daß Lymphozyten dort nicht mit eingruppiert worden sind, da Tetrazykline deren Kern nicht "färben". Diese Zellart besteht meist aus einem kompakten Kern, so daß der schmale Plasmasaum leicht übersehen werden kann.

Die Rate zwischen Epithelzellen und Leukozyten wies nach Tetrazyklin-Fluorochromierung etwa das Verhältnis 1 : 3 auf.

Durch Acridinorange konnte festgestellt werden, daß nicht alle Zellen mit Tetrazyklinen fluoreszieren. Die Rate dieser Zellen wurde durch Schätzung ermittelt, indem 10 Gesichtsfelder beurteilt wurden. Dabei stellte sich heraus, daß auf die Leukozyten der größere Prozentsatz der Zellzahl entfällt (Tabelle 6). Lymphozyten waren an ihrem kompakten, grüngelb fluoreszierenden Kern leicht zu erkennen.

Es konnte ferner festgestellt werden, daß der Zellgehalt nach Tetrazyklin-Behandlung zunimmt, manchmal um das Doppelte. Dadurch wird die Reizwirkung dieser Antibiotika demonstriert.

Abbildung 7



Zellbild der Milch einer Kuh mit c h r o n i s c h e r
M a s t i t i s . Nativpräparat 24 Stunden nach I n -
t r a v i t a l f l u o r o c h r o m i e r u n g mit
OTC und anschließender S u p r a v i t a l f l u o r o -
c h r o m i e r u n g mit Acridinorange. Die Zellen neh-
men das Acridinorange n i c h t gut auf, die Zell-
differenzierung ist erschwert.

Ganz unten rechts ist eine Epithelzelle sichtbar.

Gruppe V_b

Um den Einfluß von nekrotischem Gewebe sowie den Antibiotica Chloramphenicol (C), Penicillin (P) und Streptomycin (S) auf die Zellfluoreszenz zu untersuchen, wurden 11 Kühe mit chronischer Mastitis ausgewählt. Bei fünf dieser Kühe bestand eine Mastitis in Verbindung mit Galaktophoritis. Die Sekrete waren fibrinös oder breiartig, mitunter auch puddingartig und karamelfarben. Bei den restlichen Tieren lag Ausscheidung von Flocken aus den betroffenen Vierteln in unterschiedlicher Stärke vor. Diese Patienten hatten fast immer alte Zitzenverletzungen. Außer diesen Modellversuchen wurden Proben von zahlreichen Fällen berücksichtigt, die routinemäßig mit diesen Antibiotica behandelt worden waren.

Sämtliche Proben sind vor der Behandlung fluoreszenzmikroskopisch untersucht worden.

Die Lokalbehandlung der Viertel erfolgte entweder mit Chloramphenicol oder einer Penicillin-Streptomycin-Kombination. Chloramphenicol "forte" Eutersuspension (Chloromycetin[®] - PARKE-DAVIS) wurde in einer Dosis von 2000 mg pro Viertel intrazisternal verabreicht. Das Penicillin-Streptomycin-Präparat (Eumastol^R PS - BYK-GULDEN) wurde in der Dosis von 3 Millionen I.E. Procain-Penicillin, 520 mg Dihydrostreptomycinsulfat und 320 mg Novocainhydrochlorid verabreicht, was zwei Tuben des Präparates entspricht.

Die Untersuchung der Proben erfolgte 6 und 16 Stunden nach der Behandlung, die dann auf die Tetrazyklintherapie umgestellt wurde, bei den Kühen Nr. 63 bis 66 auf TC, Nr. 67 bis 69 auf OTC und Nr. 70 bis 73 auf PMT. 16 Stunden nach Beginn der Behandlung mit Tetrazyklinen wurden wiederum Proben zur Untersuchung entnommen.

E r g e b n i s s e :

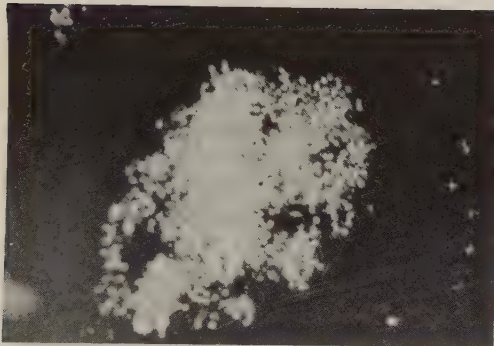
Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, hatten v o r der Behandlung alle Proben, ausgenommen drei von den Kühen Nr. 66 und 67, eine homogene, nicht spezifische bläulich-weiße oder gelblich-grüne Fluoreszenz aufzuweisen. Das gleiche Erscheinungsbild war nach der Chloramphenicol- bzw. der Penicillin-Streptomycin-Therapie zu beobachten.

Drei Proben wiesen gelbe Zellstrukturen und Bakterien auf, ähnlich wie bei Tetrazyklin-induzierter Fluoreszenz. Die Fluoreszenzerscheinungen waren recht intensiv, und die Zellen waren gegenüber einem bräunlich-grünen Untergrund deutlich abgesetzt. Sie traten als Gruppe auf oder lagen zwischen grünlich-gelbem Zelldetritus, bzw. fibrinösen Substanzen.

Nach der Tetrazyklinbehandlung zeigten alle Proben gelbe Zellfluoreszenz. In einigen Proben waren Bakterien und Phagozytose zu erkennen. Fibrin und Detritus fluoreszierten trüb dunkelbraun-gelb bis goldgelb (Abb. 8).

Das Erscheinungsbild der Milchproben von Kuh 67 und 69 war vor der Behandlung bereits identisch mit demjenigen nach der Tetrazyklinverabreichung. Es wird daher als sehr wahrscheinlich angenommen, daß diese Tiere bereits vor der Untersuchung und Aufnahme in die Klinik Tetrazykline erhalten hatten.

Abbildung 8



Übersichtspräparat aus Milch einer Kuh mit c h r o n i -
s c h e r Mastitis und Galaktophoritis.
Intensive goldgelbe Fluoreszenz der massenhaft vorhandenen
L e u k o z y t e n , F i b r i n u n d Z e l l d e -
t r i t u s (in Klumpen) sowie C. pyogenes 16 Stunden
nach Behandlung mit TC.

3.3. Diskussion und Schlußfolgerungen

Die dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen repräsentieren die Ergebnisse, die aufgrund der Bewertung von über 10 000 Viertelmilchproben vor und nach intrazisternaler, bzw. parenteraler (intravenös oder intramuskulär) Applikation von Tetracyclin-Suspension ASID, Celasin-AE Suspension CELA und Reverin-Suspension HOECHST an laktierende Kühe mit gesunden Eutern, Sekretionsstörungen oder Mastitis gewonnen wurden.

Für die Interpretation der Ergebnisse müssen gewisse Punkte besonders beachtet werden, nämlich:

- Es handelte sich um Versuche *i n v i v o* . Eine Kontrolle schied in dem Augenblick aus, in dem sich das Testmaterial im Tierkörper befand.
- Dosierung und Applikationsart der Tetrazykline in Verbindung mit dem optimalen Zeitfaktor beeinflussen die Ergebnisse.
- Der Wirkungsmechanismus der Tetrazykline ist bis zum heutigen Tage noch nicht völlig geklärt. Die Art des Präparates, sein Vehikel und das umgebende Milieu spielen eine Rolle hinsichtlich der Fluoreszenzcharakteristika.
- Es bestehen individuelle Unterschiede bezüglich der Reaktion auf die getesteten Präparate.
- Das Einbringen jedweden Materials in die Milchdrüse (seien es physiologische Lösungen, Luft, steriles Aqua destillata oder Medikamente) bedingt für sich das Entstehen eines Reizzustandes, durch Auslösen des körpereigenen Abwehrmechanismus in Form einer Leukozytose.
- Bei Mastitiden kann von einem Tag zum anderen die Virulenz der beteiligten Erreger schwanken. Es kann zur

Persistenz im Eutergewebe kommen, wodurch die Interpretation der Leukozytenzunahme erschwert werden kann. In derartig gelagerten Fällen ist es schwierig zu entscheiden, ob die Zunahme der Zellzahlen allein von der Tetrazyklin-Applikation abhängig ist, oder ob die alternierende Virulenz der Erreger selbst dabei eine Rolle spielt.

Wie aus dem Thema der Arbeit hervorgeht, dienten die Untersuchungen dem Aufschluß darüber, ob zelluläre Elemente der Milch und vorhandene Bakterien durch Tetrazykline intravital gefärbt werden können.

Native Milch weist nur eine homogene, bläulich-weiße oder blaugrüne Primärfluoreszenz nach Blaulichtanregung auf. 6 bis 16 Stunden nach Tetrazyklin-Behandlung fluoreszieren Zellen und Bakterien deutlich gelb gegenüber einem dunkleren Untergrund. Von sämtlichen vor der Behandlung beurteilten Proben wiesen nur 3 die für eine Induktion durch Tetrazykline typische Gelbfluoreszenz auf. Obwohl einige Proben mit nekrotischem Gewebsinhalt, Zelltrümmern oder Flocken intensiver gelbgrünlich fluoreszierten, waren hier keine Zellstrukturen zu erkennen. Es muß daher angenommen werden, daß die 3 positiven Reagenten bereits vor der Einlieferung in die Klinik mit Tetrazyklin enthaltenden Präparaten behandelt worden sind.

Nach Applikation von Chloramphenicol, Penicillin oder Streptomycin wurde keine Fluoreszenz beobachtet, im Gegensatz zu Untersuchungen von DIAMOND (1963). Dieser sah Fluoreszenz an Hela-Zellen nach in vitro-Behandlung mit 800 µg/ml Chloramphenicol. Die eigenen Ergebnisse stehen aber in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von DRAWERT und RÜFFER-BOCK (1965) an Zellen von *Allium cepa*.

ABERLE (1963) hat nach dem Fasten bei der Basalsekretion des Magens Gelbfluoreszenz beobachtet an Patienten, die weder eine Erkrankung des Magens gehabt hatten noch einer

Therapie mit Tetrazyklinen oder anderen fluoreszierenden Stoffen unterworfen waren. Allerdings arbeitete dieser Autor insofern unter anderen Bedingungen, als er für seine Untersuchungen eine offene UV-Lampe benutzt hat und daher nicht zwischen allgemeiner und mikroskopischer Zellfluoreszenz unterscheiden konnte.

Im Anschluß an die intrazisternale Applikation eines der drei benutzten Tetrazyklinpräparate war in all den Vierteln, die das Antibiotikum erhalten hatten, gelbe Zellfluoreszenz zu beobachten. Sowohl in Milch aus gesunden als auch erkrankten Eutern war diese Zellfluoreszenz vorhanden. Anwesende Bakterien fluoreszierten ebenfalls gelb in Fällen von latenter, akuter oder chronischer Mastitis. Phagozytose war deutlich zu erkennen in 9 Proben von insgesamt 21 Fällen mit akuter Mastitis.

Bei Dosierungen, die dem Äquivalent von 500 mg Tetrazyklin-Hydrochlorid entsprachen, zeigten TC, OTC und PMT Primärfluoreszenz während der ersten 6 Stunden und eine minimale oder gar keine Autofluoreszenz nach 16 Stunden. Die Persistenz der Autofluoreszenz schien von der Milchmenge, dem Zustand der Milchdrüse oder dem Ausmaß der Veränderungen bestimmt zu sein, sowie auch vom Laktationsstadium. Demzufolge bestand die Persistenz bei geringer Milchleistung, fibrotischen und indurierten Eutern, bzw. gegen Ende der Laktation länger. Eine verlängerte Persistenz der Primärfluoreszenz war ebenfalls bei Verabreichung der doppelten Tetrazyklin-Dosis zu beobachten, wohingegen sie bei der halben Dosis (250 mg) verkürzt auftrat.

Das durchschnittliche Maximum der Zell-, respektive Bakterienfluoreszenz wurde nach 16 Stunden beobachtet. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität oder ihr Fehlen hinterher kann der Tatsache zugeschrieben werden, daß während der Melkzeit die Menge und Konzentration der Tetrazykline, die für den Fluoreszenzeffekt erforderlich ist, mit der Milch entfernt wird. Beispielsweise wurde festgestellt, daß bei

einer mit Tetrazyklin trockengestellten Kuh noch nach 72 Stunden intensive Zellfluoreszenz nachzuweisen war. Ähnliches war hinsichtlich der Zellfluoreszenz bei Kühen mit geringer Leistung oder schweren Euterschäden zu beobachten.

ALBRIGHT et al. (1961) berichteten, daß Chlortetrazyklin in der Milch behandelter Kühe über einen Zeitraum von 5 Wochen persistiert. Beträchtliche Abweichungen bezüglich der ausgeschiedenen Menge sollen zwischen den einzelnen Kühen vorkommen. 96 Stunden nach der Behandlung mit 852 mg Oxytetrazyklin sind 0,01 U/ml Milch gefunden worden.

REUSSE (1961) berichtet über die Ausscheidung von 0,55 Einheiten/ml Milch 84 Stunden nach Behandlung mit 400 mg Aureomycin. Er teilt ferner mit, daß Oxytetrazyklin 37,3 Stunden nach der Behandlung mit 400 mg nachweisbar war.

Aus diesen Ergebnissen könnte geschlossen werden, daß die Konzentrationen zu niedrig sind, um eine Fluoreszenz zu induzieren.

RANDALL et al. (1953) und BLOBEL und BURCH (1960) fanden, daß es zu einem Übertritt von CTC und OTC aus den behandelten in die unbehandelten Viertel kommt und daß die Ausscheidung aus den unbehandelten Vierteln innerhalb der nächsten 24 Stunden nach der Behandlung erfolgt, sofern Gaben von 426 und 852 mg intramammär appliziert werden.

Über die Ausscheidung der Tetrazykline nach parenteraler Verabreichung liegen ebenfalls zahlreiche Berichte vor.

Den eigenen Untersuchungen zufolge konnte keine Zellfluoreszenz in unbehandelten Eutervierteln oder nach ausschließlich parenteraler Applikation nachgewiesen werden. Auch im Blut war keine Fluoreszenz nachzuweisen. Diese Tatsache läßt erkennen, daß die Konzentrationen in den vorliegenden Fällen zu gering waren, um eine Fluoreszenz auslösen zu können. Des weiteren sollte auf die

Möglichkeit hingewiesen werden, daß die Tetrazykline durch Adsorption an die Zellen Fluoreszenzerscheinungen bewirken können. Daß die zellulären Elemente des Blutes keine Fluoreszenz aufwiesen könnte durch Feststellungen von YEARY (1962) erklärt werden, wonach eine so weitgehende Bindung der Tetrazykline an die Serumproteine erfolgt, daß eine Anlagerung an die Zellen nicht mehr möglich ist.

In allen behandelten Vierteln zeigten die Zytoplasma-Anteile der mit der Milch ausgeschiedenen Zellen eine grünlich-gelbe bis goldgelbe Fluoreszenz, der Kern hingegen wurde nicht gefärbt und blieb dunkel. Mit fortgesetzter Erregerlichteinwirkung nahm die Intensität der Fluoreszenz zu und ein Maschenwerk von Strängen trat im Plasma auf. In einigen Zellen waren auch Granula zu erkennen. Damit stehen diese Befunde im Gegensatz zu denen von DU BUY und SHOWACRE (1961), die von einer Lokalisation der Tetrazykline ausschließlich in den Mitochondrien sprechen. Andererseits besteht eine gewisse Übereinstimmung mit DRAWERT und RÜFFER-BOCK (1965), die diese Stränge als endoplasmatisches Retikulum ansehen.

Die Zelldifferenzierung beschränkt sich nur auf Form, Gestalt und Größe. Auf diese Weise konnten die squamösen Epithelien à conto ihrer flachen oder gefalteten Formen, bis zu einem gewissen Grad auch durch ihre Größe, bestimmt werden. Die Zylinderepithelien waren mehr oder weniger oval bis spindelförmig, und die Leukozyten rund mit Durchmesser von 7,5 bis 13 μ . Kolostralkörperchen wiesen Metachromasie auf, in Form von zytoplasmatischen Einschlüssen.

Da keine Kernfärbung vorhanden war, war die Differenzierung der Leukozyten unmöglich. Gelegentlich ließen die dunklen Bezirke im Zytoplasma eine Segmentierung vermuten. Sobald jedoch das strangartige Maschenwerk auftrat, wo-

durch mehr dunkle Bezirke hervorgehoben wurden, war die Interpretation hinsichtlich der polymorphkernigen Leukozyten nur mit größter Vorsicht möglich. Ähnlich geformte kubische Zellen konnten leicht mit Leukozyten verwechselt werden, da auch sie oftmals rundliche Formen aufweisen.

Wegen des Fehlens jeglicher Kernfärbung muß angenommen werden, daß Lymphozyten bei diesen Untersuchungen überhaupt nicht berücksichtigt worden sind, da der weitaus größte Teil dieser Zellen aus dem runden Kern besteht. Der schmale Zytoplasmasaum, der das Tetrazyklin aufgenommen haben dürfte, kann sehr leicht übersehen werden.

Ein Vergleich zwischen den Gesamtzellzahlen aufgrund der Beurteilung der durch Tetrazykline induzierten Fluoreszenz einerseits sowie nach Supravitalfluorochromierung mit Acridinorange andererseits ließ deutlich erkennen, daß Tetrazykline allein häufig nicht alle vorhandenen Zellen anfärben. Während einige der ungefärbten Zellen als Lymphozyten identifiziert werden konnten, gab es auch andere Zellen, die mit Tetrazyklinen keine Fluoreszenz erkennen ließen. Sehr schwach fluoreszierende Zellen können außerdem leicht mit Fettröpfchen verwechselt werden.

Die Zunahme der Zellzahlen, insbesondere der Leukozyten, wurde in den Gruppen I und III nach Tetrazyklinapplikation augenscheinlich. Dadurch wurde auch die Reizwirkung dieser Antibiotika demonstriert (vergleiche COTT, 1961).

Bei schweren Sekretionsstörungen und chronischen Mastitiden sowie in allen akuten Fällen war die Fluoreszenzintensität viel größer. Das kann einerseits durch die hohen Zellzahlen erklärt werden, die durch additive Wirkung eine Zunahme der gesamten Fluoreszenzintensität bewirken. Andererseits erhebt sich die Frage, ob nicht durch pathologische Prozesse die biochemischen Verhältnisse in den Zellen dahingehend verändert werden, daß eine größere Affinität der Tetrazykline zu diesen Zellen vorliegt. In einigen

Fällen war noch nach dreiwöchiger Aufbewahrung bei + 4° C Fluoreszenz zu beobachten.

Außer bei Knochen ist eine starke Tetrazyklinfluoreszenz-Intensität und -Persistenz in Tumorgeweben und nekrotischen Gewebsteilen von verschiedenen Untersuchern beobachtet worden, wie z. B. RALL et al. (1957), VASSAR et al. (1962), ENGELBART (1964).

In den Gruppen I und III war die Intensität der Zellfluoreszenz in den Endgemelken gegenüber den Anfangsgemelken geringgradig verstärkt.

In Mastitismilch (Gruppen III, IV und V) waren sowohl extra- als auch intrazellulär gelagerte Bakterien zu erkennen. Diese fluoreszierten schwach gelb bis goldgelb und konnten differenziert werden als Kokken, Stäbchen und pleomorphe Formen. Von der körnigen Tetrazyklinautofluoreszenz konnten sie abgegrenzt werden durch ihre Beweglichkeit oder auch den gleichmäßigen Glanz, der mit der scharfen, leuchtenden Fluoreszenz der Tetrazyklin-Granula kontrastierte.

Die am häufigsten anzutreffenden Kokken waren entweder einzeln gelagert, oder sie traten in kurzen, teilweise auch langen Ketten auf. Die für Staphylokokken typischen Maulbeer- oder Traubenformen, wie man sie in Grampräparaten findet, waren nicht anzutreffen. Diese Kokkenformen zeigten eine gleichmäßige Fluoreszenz mit klarer Peripherie.

Die Stäbchen und oval geformten Bakterien hatten eine mehr körnige, granulierte Fluoreszenz an den Polen, während die Mitte schwach fluoreszierte oder sogar dunkel blieb. Diese Formen sind in Übereinstimmung mit MALATYAN (1962) als *E. coli* und Pasteurellen anzusehen. Auch kulturell und lichtmikroskopisch erwiesen sich diese Formen in den eigenen Versuchen als coliforme Keime.

Pleomorph geformte Bakterien traten als gelb fluoreszierende kurze oder lange Stäbchen, mitunter auch als ovale oder kokkenartige Gebilde in Erscheinung. Sie erwiesen sich kulturell und im gramgefärbten Ausstrich als Corynebakterien. Da sie in den betreffenden Proben immer sehr zahlreich vorlagen war es leicht, sie zu diagnostizieren.

Phagozytierte Bakterien erschienen immer deutlicher als die gelben zytoplasmatischen Stränge. In einigen Fällen schienen sie sich aus dem Plasma hervorzuwölben. DU BUY et al. (1964) glauben, daß gewisse Parasiten eine sie umgebende intrazytoplasmatische Membran erhalten, wenn sie phagozytiert werden. Sie nehmen ferner an, daß diese Membran für Tetrazykline undurchdringlich ist, so daß die Parasiten nach Tetrazyklinbehandlungen keine Fluoreszenz zeigen. Extrazellulär gelagerte Parasiten hingegen nehmen das Antibiotikum auf und sind sofort sichtbar, während intrazellulär gelagerte erst nach dem Absterben der Wirtszelle zu erkennen sind.

Es war nicht das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, diese Feststellung zu bestätigen. Bei der Gegenfluorochromierung mit Acridinorange war die gleiche Verteilung der Phagozytosen zu sehen wie nach Tetrazyklineinwirkung. Der Unterschied bestand nur darin, daß der Kontrast bei Acridinorange stärker war, wodurch die Diagnose erleichtert wurde.

Schlußfolgerungen:

Aus den Ergebnissen der eigenen Versuche geht hervor, daß Tetrazykline eine gelbe zytoplasmatische Fluoreszenz von Zellen und Bakterien aus normaler und entzündlich veränderter Milch induzieren. Der Kern bleibt jedoch ungefärbt. Die Zelldifferenzierung beschränkt sich lediglich auf Form, Gestalt und Größe. Als optimale Zeit für das Auftreten der deutlichsten Zell- und Bakterienfluoreszenz wurden 16 Stunden nach Applikation der Tetrazykline in die Milchdrüse ermittelt.

Innerhalb dieses Zeitraumes bewirkt eine Reizung des Eutergewebes eine Zunahme des Zellgehaltes.

Aus diesem Grunde kann festgestellt werden, daß die T e t r a z y k l i n e als I n t r a v i t a l - f l u o r o c h r o m e für die M a s t i t i s - d i a g n o s e u n g e e i g n e t sind und keinen deutlichen Vorteil gegenüber der Supravitalfluorochromierung mit Acridinorange erbringen.

A l l e r d i n g s k a n n e s s i c h a l s s e h r n ü t z l i c h e r w e i s e n , d i e I n t r a v i t a l f l u o r o c h r o m i e r u n g d e r Z e l l e n a l s H i n w e i s d a f ü r z u b e n u t z e n , d a ß i n V e r d a c h t s - f ä l l e n e i n e B e h a n d l u n g d u r c h d e n B e s i t z e r o d e r a n d e r e P e r - s o n e n , i n d e r e n H ä n d e A n t i b i - o t i k a n i c h t g e h ö r e n , s t a t t - g e f u n d e n h a t .

3.4. Zusammenfassung

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Milch sind an Proben von Tieren mit gesunden und krankhaft veränderten Eutern durchgeführt worden. Es sollte festgestellt werden, ob die üblicherweise für die Mastitistherapie eingesetzten Tetrazyklin-Präparate in der Lage sind, mit der Milch ausgeschiedene Zellen und Bakterien intravital zu färben, um somit als diagnostische Fluorochrome zum Einsatz zu kommen. Die Überprüfung erfolgte nach intrazisternaler Instillation oder parenteraler (intramuskulär, intravenös) Applikation.

- Als Testmaterial dienten drei Präparate:

Tetracyclin-Suspension ASID (TC),
Celasin-AE-Suspension CELA (OTC) und
Reverin-Suspension HOECHST (PMT).

- Bei der lokalen Applikation wurde das Äquivalent von 500 mg Tetrazyklin-HCl, bzw. die doppelte Menge instilliert.
- Die parenterale Verabreichung erfolgte in Mengen von:

TC	0,06 ml/kg,
OTC	2 bis 4 ml/50 kg und
PMT	2 ml/50 kg Körpergewicht.
- Native Milch zeigte ohne vorhergehende Tetrazyklin-Behandlung eine homogene bläulichweiße bis gelbgrüne Autofluoreszenz.
- Im Anschluß an die intrazisternale Verabreichung war innerhalb der ersten 6 Stunden immer eine intensiv gelbe Autofluoreszenz in den Milchproben aus tetrazyklin-behandelten Euterviervierteln festzustellen, wodurch die Zellfluoreszenz überdeckt wurde. Nach 16 Stunden war die Tetrazyklin-Autofluoreszenz nur minimal oder sie fehlte ganz.

- Nach 16 Stunden bestand gelbe Zell- oder Bakterienfluoreszenz in den Milchproben aus behandelten Vierteln. Das Zytoplasma der Zellen fluoreszierte schwach gelb bis goldgelb, die Zellgrenzen waren deutlich markiert. Der Zellkern färbte sich nicht an und blieb dunkel. Eine Zelldifferenzierung war nur begrenzt möglich durch die Beurteilung von Form, Gestalt und Größe. Wegen ihres großen Zellkernes und schmalen Plasmasaumes waren Lymphozyten nicht darstellbar.
- Bakterien konnten deutlich als Kokken, Stäbchen und pleomorphe Formen klassifiziert werden. Phagozytierte Keime fluoreszierten ebenfalls gelb.
- Persistenz, Dauer und Intensität der Tetrazyklin-Autofluoreszenz und der Zellfluoreszenz standen in Beziehung zur produzierten Milchmenge, dem Zustand des Eutergewebes und dem Laktationsstadium. Die durch TC induzierte Intensität der Zellfluoreszenz war stärker als die durch OTC oder PMT hervorgerufene.
- In Milchproben aus unbehandelten Eutervierteln und nach parenteraler Tetrazyklin-Applikation wurde keine Fluoreszenz nachgewiesen. Ebenso fehlten Fluoreszenzerscheinungen in Blutproben.
- Chloramphenicol, Penicillin und Streptomycin induzierten niemals Zellfluoreszenz.
- Dreimal wurde Zellfluoreszenz v o r der Behandlung mit Tetrazyklinen festgestellt. Es wird angenommen, daß diese Tiere einer Tetrazyklin-Therapie vor der Aufnahme in die Klinik unterworfen waren.
- Nach intrazisternaler Tetrazyklin-Therapie war s t e t s eine zahlenmäßige Z u n a h m e der L e u k o z y - t e n zu beobachten.
- Aus den durchgeführten Versuchen kann geschlossen werden,

daß Tetrazykline als intravital wirkende Fluorochrome für die Mastitisdiagnose ungeeignet sind, da ihre Reizwirkung auf das Eutergewebe zu stark ist und eine zu lange Zeitspanne bis zum Auftreten des Fluoreszenzeffektes verstreicht. Sie sind allerdings in der Lage, in der Milch auftretende Zellen und Bakterien zu färben. Deshalb kann die Anwendung dieser Fluoreszenztechnik unter Umständen sehr nützlich sein für den Nachweis des unberechtigten Einsatzes von Tetrazyklinen durch Laien.

3.5. DISCUSSION CONCLUSION AND SUMMARY

Intravital Fluorochromation of Milk using Tetracyclines with Regard to the Diagnosis of Mastitis

The results outlined represent evaluation of fluorescence microscopical examinations of over 10 000 quarter milk samples before and after local intracistern, or parenteral (intramuscular or intravenous) application of Tetracyclin-Suspension ASID (TC), Celasin-AE-Suspension CELA (OTC), and Reverin-Suspension HOECHST (PMT) to lactating cows with healthy udders and cows having non-specific secretory disturbances or mastitis.

In the interpretation of the results certain points must be borne in mind, namely:

- These were in vivo experiments and there was no control once the test materials were within the animal.
- The dosage and route of application of the tetracyclines coupled with the optimal time factor influence the results.
- The mechanism of action of the tetracyclines is up to date not fully explained; the form, milieu, and vehicle themselves play a role in the fluorescence characteristics.
- Differences exist between the reaction of individual animals to these test materials.
- Infusion of any material into the bovine udder (be it physiological solutions, air, sterile water or medication) is in itself an induced irritation which alarms the body defensive mechanism and is answered by an increase in phagocytic leucocytes.
- In mastitis cases day to day variations in the virulence of the pathogenic organisms and persistence of the udder tissue occur, thus complicating interpretation of increase of leuk-

ocytes; it is in such cases difficult to ascertain if increase in the number of cells was solely due to the tetracyclines or whether the alternating virulence of the pathogens played a direct role.

As laid down in the theme of this work, the investigations served to find out if the cellular elements and bacteria present in milk could be stained intravitaly by tetracyclines.

Native milk shows only a homogenous bluish-white or blue-green primary fluorescence when irradiated with blue light. 6 to 16 hours following treatment with tetracyclines, cellular elements or bacteria fluoresce distinctly yellow against a darker background. Of all the samples examined before treatment with tetracyclines only 3 showed the yellow cellular fluorescence typical of tetracycline-induced fluorescence. Although samples with necrotic tissue, cell debris or flocks fluoresced more intensive yellowish-green, no cellular structure was evident. The 3 positives from the untreated specimens suggest a prior local intramammary treatment of these animals with tetracycline antibiotics shortly before their admission into the clinic.

Contrary to the findings of DIAMOND (1963) who reported seeing fluorescence in Hela cells after in vitro treatment with 800 µg/ml Chloramphenicol, no cellular fluorescence was observed in milk after application of Chloramphenicol, Penicillin, or Streptomycin. The results in this experiment are therefore in agreement with observations by DRAWERT and RÜFFER-BOCK (1965) on *Allium cepa* cells.

ABERLE (1963) observed yellow fluorescence in the fasting and basal secretions of patients who did not have gastric disease and who had no previous treatment with tetracycline or other fluorescing agents. However ABERLE worked under different conditions and used an open UV-lamp for his examinations; he could not have differentiated between gross and

microscopical cellular fluorescence.

Following local intracistern application of any of the three tetracyclines, there was positive yellow cellular fluorescence in all samples from quarters that had received the antibiotic. - viz. milk from both healthy and mastitic udders showed cellular fluorescence. Bacteria too fluoresced yellow in the cases of latent acute or chronic mastitis. Phagocytosis was clearly apparent in 9 out of 21 samples from cases of acute mastitis.

At dosages of the equivalent of 500 mg Tetracycline-Hydrochloride, TC, OTC, and PMT showed primary fluorescence for the first 6 hours and minimal or no autofluorescence after 16 hours. The persistence of autofluorescence seemed to be influenced by the amount of milk production, state of the udder, or grade of udder damage as well as stage of lactation. Consequently persistence was longer in instances of low production, fibrotic indurated udders or at the end of lactation. Persistence of primary fluorescence was also proportionately longer after treatment with double dosage (1000 mg Tetracycline-HCl) and the converse was true with dosages of 250 mg per quarter.

On the average maximum cellular or bacterial fluorescence was observed 16 hours after tetracycline application. The decrease in fluorescence intensity or absence of fluorescence thereafter can be attributed to the fact that at milking time the amount and concentration of tetracycline necessary to effect fluorescence is removed with the milk. It was noted, for instance in one cow, dried off with tetracycline, that intense cellular fluorescence was present after 72 hours. Similarly in cows with low production or severe udder damage cellular fluorescence persisted longer.

ALBRIGHT et al. (1961) report that chlortetracycline persists in milk of treated cows for 5 weeks, with considerable variation existing between cows in the amount of this antibiotic excreted. 0.01 U/ml of oxytetracycline was found in milk 96 hours after treatment with 852 mg of the drug.

REUSSE (1961) reports that 0.55 U/ml of milk of Aureomycin was found 84 hours after treatment with 400 mg and that oxy-tetracycline was demonstrable in milk 37.3 hours after application of 400 mg.

It would appear from the results that such concentrations are too low to induce fluorescence.

RANDALL et al. (1953) and BLOBEL and BURCH (1960) found that there was a transfer of chlortetracycline and oxytetracycline from treated to untreated quarters and that elimination of the antibiotics from the untreated quarters occurred within 24 hours following intramammary infusion of 426 and 852 mg. Excretion of tetracycline in milk after parenteral administration has also been widely reported.

In this investigation no cellular fluorescence was detected in samples from untreated quarters or in the milk following only intramuscular or intravenous injection of the tetracyclines; nor was fluorescence detected in blood specimens. This shows again that the concentrations in these cases were too small to induce fluorescence. It also suggests the possibility that the tetracyclines effect fluorescence through adsorption to the cells. That the blood cells did not show fluorescence may be explained according to the findings of YEARY (1962), that a high serum protein binding of tetracycline occurs, thus presumably not availing enough to combine with the blood cells.

In all the treated quarters the cells showed a greenish-yellow to gold-yellow cytoplasmic fluorescence; the nucleus on the other hand was not stained and remained dark. With continued irradiation the intensity of fluorescence increased and a mesh-work of strands appeared in the cytoplasm and granular material was evident in some cells. The findings thus contrast with those of DU BUY and SHOWACRE (1961), who reported a localisation of tetracyclines only in the mitochondria. On the other hand they are more in agreement with those of DRAWERT and RÜFFER-BOCK (1965), that these strands could be endoplasmatic reticulum.

Cell differentiation was only limited to form, shape and size. On this basis the squamous epithelial cells could be identified on account of their flat or folded forms and to some extent their large size. The columnar epithelial cells were more or less oval or spindle shaped. The leucocytes were round and measured 7.5 to 13 μ . The colostrum corpuscles exhibited metachromasia of inclusion bodies in their cytoplasm of yellow or brownish or even reddish fluorescence.

Since there was no nuclear stain, the differentiation of the leucocytes was impossible. Occasionally the dark areas in the cytoplasm suggested a resemblance to segmentation. But as a meshwork of strands appear revealing more dark areas, interpretation of these as segmented polymorphs must be highly guarded. Similarly cuboidal epithelial cells could easily be taken for leucocytes as they often exhibit round forms.

Because of lack of nuclear stain, it is assumed that lymphocytes were not encountered with in this investigation. The greater mass of these cells is made up of the round nucleus so that the small amount of cytoplasm which might have taken up the tetracycline was easily overlooked.

Comparison of total cell numbers seen with the tetracycline induced fluorescence and supravital acridinorange fluorochrom-
ation showed that often, tetracyclines did not stain all the cells. While some of the unstained cells could be traced to lymphocytes, other cell types too showed up where they did not fluoresce with the tetracyclines. Very faintly fluorescent cells can also easily be mistaken for fat droplets.

Positive increase of cell numbers especially leucocytes was proved in groups I and III after tetracycline application thus indicating the irritant effect of these antibiotics (c.f. COTT, 1961).

The intensity of fluorescence in severe cases of secretory disturbances and chronic mastitis as well as all the acute

mastitis cases was much greater. This can be explained on one hand on account of the large numbers of cells which additively increased the total fluorescence intensity. On the other hand this raises a suggestion that the pathological processes alter the cytochemistry of these cells thus increasing the affinity of tetracycline for them. Some of the samples were still fluorescent after preservation for three weeks at + 4° C.

Apart from bone, strong tetracycline fluorescence intensity and persistence have been noticed in tumor tissue and necrosis by several workers, e.g. RALL et al. (1957), VASSAR et al. (1962), ENGELBART et al. (1964). In groups I and III the intensity of cellular fluorescence in the end strip specimens was slightly stronger than in the foremilk specimens.

In mastitic milk (groups III, IV and V), extra- and intracellular bacteria were detectable. These fluoresced weakly yellow to golden yellow and could be differentiated into cocci, rods and pleomorphic forms. The bacteria could be differentiated from granular tetracycline autofluorescence on account of their motility or uniform glow which contrasted with the sharp bright fluorescence of the tetracycline granules. The cocci, which were the most frequent, occurred either singly or in short chains or in cases of acute and severe chronic mastitis in long chains. The mulberry or grape forms typical of staphylococci often seen with Gram's stain, were not noticed in the samples. These cocal forms of bacteria showed a uniform fluorescence with a clear periphery.

The rod or oval forms of bacteria showed more granular fluorescence at the polar ends, the centre remaining weakly fluorescent or sometimes dark. These forms were suggestive of *E. coli* and *Pasteurella* as in findings by MALATYAN (1962). On culture and with light microscopy, they were shown to be coliform bacteria.

The pleomorphic bacteria consisting of yellow fluorescent short or long rods or oval and sometimes cocal bodies could be trac-

ed back to Corynebacteria as shown by results from cultures and Grams stain. Because of their large numbers in the specimens they presented an easy diagnosis.

Phagocytosed bacteria appeared more solid than the yellow plasmatic strands. In some cases they appeared to be walled up from the cytoplasm. DU BUY et al. (1964) believe that certain parasites when phagocytosed become surrounded by an intracytoplasmic membrane, and that this membrane is impermeable to tetracycline so that the parasites show no fluorescence after tetracycline treatment. They further observed that extracellular parasites on the other hand take the antibiotic and are immediately visible; intracellular parasites become visible only after the death of the host cell.

It was not the aim of this work to verify this statement; but counter fluorochemistry with acridinorange showed the same distribution of phagocytosis as with tetracycline, the difference being that the contrast with acridinorange was greater, thus making the diagnosis easier.

Conclusion:

From the results of the experiments it is concluded that tetracyclines induce yellow cytoplasmic fluorescence of the cells and bacteria in normal and mastitic milk, but the nucleus remains unstained. Cell differentiation is limited only to form, shape and size. The optimal time required for the best cellular and bacterial fluorescence was 16 hours following intramammary application. By this time an irritation of the udder tissue leads to increase in the number of cells.

Because of these reasons, tetracyclines are shown to be unsuitable as intravital fluorochemicals for the diagnosis of mastitis, and show no obvious advantage over supravital fluorochromation with acridinorange.

But the technique could prove

very useful in confirming suspicious cases involving the injudicious use of these antibiotics by farmers or laymen.

Summary:

Fluorescence microscopical investigations have been conducted on lactating cows having healthy and diseased udders with a view to find out if the tetracyclines commonly used in mastitis therapy could intravitaly stain the cells and bacteria in milk and therefore be used as intravital fluorochromes for mastitis diagnosis after intracistern instillation or intramuscular or intravenous application.

- The test materials used were:

Tetracyclin-Suspension ASID (TC),
Celasin-AE-Suspension CELA (OTC) and
Reverin-Suspension HOECHST (PMT).

- For local intracistern instillation the dosage was the equivalent of 500 mg Tetracycline-HCl or the double amount.

- For parenteral application the dosages used were:

TC at 0.06 ml/kg,
OTC at 2 - 4 ml/50 kg, and
PMT at 2 ml/50 kg body weight.

- Native milk without tetracycline treatment showed a homogenous bluish-white to yellowish-green autofluorescence.
- For the first 6 hours following intramammary application of the antibiotics, there was always an intense yellow tetracycline autofluorescence in the samples from treated quarters, thus masking cellular fluorescence. By 16 hours tetracycline autofluorescence was minimal or absent.
- 16 hours following intramammary application of the tetracyclines

there was yellow cellular or bacterial fluorescence in samples from treated quarters.

- The cytoplasm of the cells fluoresced weakly yellow to golden yellow and cell boundaries were clearly marked; the nucleus was not stained and remained dark. Cell differentiation was limited to form, shape and size. Lymphocytes were not stained on account of their large nucleus and small cytoplasm.
- Bacteria could clearly be classified as cocci, rods or pleomorphic forms. Phagocytosed bacteria too fluoresced yellow.
- Persistence, duration and intensity of tetracycline autofluorescence and cellular fluorescence was related to the amount of milk production, state of udder tissue and stage of lactation. The intensity of cellular fluorescence induced by TC was stronger than that by OTC and PMT.
- No cellular or bacterial fluorescence was detected in samples from untreated quarters or after parenteral tetracycline administration. Fluorescence was also absent in blood samples.
- Chloramphenicol, Penicillin and Streptomycin did not induce any cellular fluorescence.
- Three samples showed cellular fluorescence prior to tetracycline administration. It is suggested that these animals received local tetracycline therapy shortly before their admission to the clinic.
- An increase in number of leucocytes always occurred after intramammary tetracycline therapy.

From the experiments it is concluded that, although tetracyclines stain the cells and bacteria in milk, because of their irritant effect on the udder tissue and the long optimal time necessary for this fluorescence effect they are unsuitable as intravital flu-

orochromes for mastitis diagnosis. The fluorescence microscopical technique could, however, prove very useful in the detection of injudicious use of the tetracyclines by laymen or farmers.

3.6. R É S U M É

L'intravitale fluorochromatisation du lait avec les tétracyclines en vue du diagnostic de la Mastitis

Les recherches du lait au microscope fluorescent ont été effectuées sur des échantillons d'animaux ayant des mamelles saines et atteintes de lésions. Le but des recherches est de savoir, si les médicaments à base de tétracyclines, habituellement employés dans la thérapie de la mastitis, sont capables d'être colorés intravitalement avec les cellules et les bactéries rejetées en même temps que le lait, donnant ainsi dorénavant la possibilité d'utiliser un fluorochrome diagnostiquant. Le contrôle fut effectué après instillation intracysternale ou par application parentérale (intramusculaire, intraveineuse).

Comme matériel de test, l'on utilisa les trois produits suivants:

Tetracyclin-Suspension ASID (TC),
Celasin-AE-Suspension CELA (OTC) et
Reverin-Suspension HOECHST (PMT).

Dans l'utilisation locale de ces produits, l'on instilla l'équivalent de 500 mg de tétracycline-HCl, ou alors la quantité double.

L'administration parentérale fut effectuée avec les quantités suivantes:

TC 0,06 ml/kg,
OTC 2,0 à 4,0 ml/50 kg et
PMT 2,0 ml/50 kg poids du corps.

Le lait à l'état naturel, sans traitement préalable à la tétracycline montre une homogène autofluorescence allant du bleu-clair au jaune-vert.

À la suite de l'administration intracysternale, l'on constatait toujours au cours des six premières heures une intensive autofluorescence jaune dans les échantillons de lait provenant de parties de mamelles traitées à la tétracycline, ce qui rendait la fluorescence cellulaire invisible. Après seize heures l'autofluorescence de la tétracycline était minimale ou disparaissait complètement.

Après seize heures apparaissait une autofluorescence cellulaire ou bactérielle jaune dans les échantillons de lait provenant de parties de mamelles soignées.

Le cytoplasme des cellules était d'une fluorescence jaunâtre allant jusqu'au jaune-or, les limites cellulaires restant clairement marquées. Le noyau cellulaire n'absorbant point de couleur restait sombre. Une différenciation cellulaire n'était seulement que partiellement possible par l'analyse de forme, de structure, et de taille. A cause de leur gros noyau cellulaire et de la faible marge du plasma, l'on ne pouvait guère discerner les lymphocytes.

L'on pouvait classer les bactéries comme cocci, bâtonnets et pleomorphes formes. Les germes phagocytés montraient aussi une fluorescence jaune.

La persistance, la durée et l'intensité de l'autofluorescence de tétracycline et de la fluorescence cellulaire sont en corrélation avec la quantité de lait produit, l'état du tissu mamélaire et la phase de lactation. L'intensité de fluorescence cellulaire induite par le TC est plus élevée que celle du OTC ou du PMT.

L'on ne constata point de fluorescence dans les échantillons de lait provenant de parties de mamelles non traitées et après une parentérale application de la tétracycline. De la même manière, toute trace de fluorescence avait disparu dans les échantillons de sang.

L'on découvrit trois fois une fluorescence cellulaire a v a n t

le traitement aux tétracyclines. Il est à penser que ces animaux avant leur entrée en clinique aient subi un traitement à base de tétracycline.

Après une thérapeutique intracysternale à la tétracycline, l'on constatait t o u j o u r s un accroissement numérique de leucocytes.

Des expériences réalisées, il serait à déduire que les tétracyclines comme un fluorochrom intravital p o u r l e diagnostic de la mastitis sont i n a p p r o p r i é e s , car leur effet excitant sur le tissu cellulaire est trop élevé et il s'écoule un long temps avant l'apparition d'effets fluorescents. Cependant ils sont capables de colorer les cellules et les bactéries apparaissant dans le lait. C'est pourquoi l'emploi de cette technique de fluorescence, pourrait à l'occasion servir pour détecter très utilement l'emploi inopiné de tétracyclines par des novices.

3.7. Tabellen

In den Tabellen 1 bis 7 sind nachfolgend aufgeführte Abkürzungen benutzt worden:

VR	=	Euterviertel vorne rechts
HR	=	Euterviertel hinten rechts
VL	=	Euterviertel vorne links
HL	=	Euterviertel hinten links
ZLV	=	Zellgehalt leicht vermehrt
VZ	=	Vermehrter Zellgehalt
K	=	Kolostralphase
M	=	Frischmelkend, bzw. auf der Höhe der Laktation
A	=	Altmelkstadium
AMP	=	Aulendorfer Mastitis Probe
AO	=	Acridinorange
GF	=	Gesichtsfeld
C	=	Chloramphenicol
P	=	Penicillin
S	=	Streptomycin
E	=	Epithelzellen
G	=	Granulozyten
L	=	Lymphozyten

Folgende Symbole finden für die Beurteilung des Zellgehaltes bei Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie Verwendung:

Fluoreszenz durch Tetrazykline:

O	=	keine Zell- oder Bakterienfluoreszenz durch Tetrazykline
*	=	1 bis 5 Zellen/Gesichtsfeld
**	=	6 bis 15 Zellen/Gesichtsfeld
***	=	16 bis 30 Zellen/Gesichtsfeld
****	=	über 30 Zellen/Gesichtsfeld

Fluoreszenz durch Acridinorange:

+	=	1 bis 5 Zellen/Gesichtsfeld
++	=	6 bis 15 Zellen/Gesichtsfeld
+++	=	16 bis 30 Zellen/Gesichtsfeld
++++	=	über 30 Zellen/Gesichtsfeld

Die kulturell ermittelten Keimarten sind unter folgenden Zeichen erwähnt:

kW	=	kein Wachstum
M	=	Mikrokokken
S	=	Staphylokokken
Str	=	Streptokokken
Cory.	=	Corynebakterien
Colif.	=	Coliforme Keime

Tabelle 1: Zellfluoreszenz nach intrazisternaler Tetrazyklinapplikation bei Kühen mit gesunden Eutern (Gruppe I)

Kuh Nr.	Viertel	Behandeltes Viertel	Medikament u. Dosierung	Zellfluoreszenz durch Tetrazykline nach Std.										Zellfluoreszenz durch AO nach 16 Std.
				3	6	16	24	36	48	72				
1	VR	VR	5,0 TC	*	*	**	*	0	0	0	0	0	++	
	HR	-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
	VL	-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
M	HL	HL	10,0 TC	0	*	**	**	0	0	0	0	0	++	ZLV
	VR	-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
	HR	HR	5,0 TC	*	*	*	*	0	0	0	0	0	+	
A	VL	VL	10,0 TC	0	0	**	**	*	0	0	0	0	++	ZLV
	HL	-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
3	VR	VR	20,0 TC	0	0	**	**	*	*	0	0	0	+++	VZ
	HR	HR	10,0 TC	0	0	**	**	0	0	0	0	0	+++	VZ
	VL	VL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
M	HL	HL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
4	VR	VR		0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	HR	HR		0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	VL	VL	10,0 TC	0	*	**	*	0	0	0	0	0	++	ZLV
M	HL	HL	20,0 TC	0	*	**	**	*	*	0	0	0	+++	VZ
5	VR	VR	4,0 OTC	0	*	*	0	0	0	0	0	0	+	
	HR	HR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
	VL	VL	8,0 OTC	0	*	**	**	0	0	0	0	0	++	ZLV
M	HL	HL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
6	VR	VR	8,0 OTC	0	0	**	*	0	0	0	0	0	+++	VZ
	HR	HR	16,0 OTC	0	0	**	**	*	0	0	0	0	+++	VZ
	VL	VL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
M	HL	HL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
7	VR	VR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	(nach 24 Std.)
	HR	HR	5,0 PMT	0	0	**	***	0	0	0	0	0	+++	
	VL	VL	10,0 PMT	0	0	**	***	**	0	0	0	0	+++	
K	HL	HL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	
8	VR	VR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
	HR	HR	10,0 PMT	0	*	**	***	*	0	0	0	0	+++	VZ
	VL	VL	20,0 PMT	0	0	**	***	**	*	0	0	0	+++	VZ
M	HL	HL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
9	VR	VR	10,0 PMT	0	0	**	**	0	0	0	0	0	+++	VZ
	HR	HR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
	VL	VL		0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
M	HL	HL	20,0 PMT	0	0	***	**	**	*	0	0	0	+++	Reizung

Tabelle 2: Zytologische Befunde bei Kühen mit Sekretionsstörungen (Gruppe II):

1. anhand der nach Broadhurst gefärbten Direktausstriche, 2. anhand der mit AO fluorochromierten Nativpräparate und 3. bei Präparaten nach intrazisternaler Tetrazyklinapplikation.

Kuh Nr.	Viertel	Direktausstrich n. Broadhurst	Nativ AO	Behandeltes Viertel	Medikament u. Dosierung	Zellfluoreszenz durch Tetrazykline nach				
						6	16	24	36	48 Std.
10 A	VR	0,2	10/GF			0	0	0	0	0
	HR	0,1	5/GF			0	0	0	0	0
	VL	20	60/GF	VL	10,0 TC	0	***	**	*	0
	HL	0,2	12/GF			0	0	0	0	0
11 K	VR		20/GF			0	0	0	0	0
	HR	0,2	20/GF			0	0	0	0	0
	VL	25	80/GF	VL	10,0 TC	*	***	**	*	0
	HL	20	80/GF	HL	20,0 TC	*	***	***	*	*
12 K	VR	3,2	80/GF	VR	10,0 TC	**	***	***	**	0
	HR	3,1	40/GF			0	0	0	0	0
	VL		60/GF			0	0	0	0	0
	HL	10	100/GF	HL	10,0 TC	**	***	***	**	*
13 M	VR		2/GF			0	0	0	0	0
	HR		6/GF			0	0	0	0	0
	VL	0,1	30/GF	VL	10,0 TC	*	**	*	0	0
	HL	2,0	3/GF			0	0	0	0	0
14 M	VR	-	3/GF			0	0	0	0	0
	HR	0,1	6/GF			0	0	0	0	0
	VL	0,1	20/GF	VL	20,0 TC	0	**	**	*	0
	HL	0,2	12/GF			0	0	0	0	0
15 K	VR	-	2/GF			0	0	0	0	0
	HR	10	50/GF	HR	20,0 TC	0	***	***	*	*
	VL	-	1/GF			0	0	0	0	0
	HL	-	3/GF			0	0	0	0	0
16 M	VR	-	3/GF			0	0	0	0	0
	HR	1,8	12/GF			0	0	0	0	0
	VL	0,4	15/GF	VL	10,0 OTC	*	***	**	0	0
	HL	-	2/GF			0	0	0	0	0
17 M	VR	-	4/GF			0	0	0	0	0
	HR	0,8	20/GF			0	0	0	0	0
	VL	-	3/GF			0	0	0	0	0
	HL	3,0	25/GF	HL	8,0 OTC	0	***	**	**	0
18 K	VR	10	60/GF	VR	8,0 OTC	0	**	***	*	0
	HR	5	30/GF			0	0	0	0	0
	VL	1,8	50/GF			0	0	0	0	0
	HL	0,9	30/GF			0	0	0	0	0
19 A	VR	-	3/GF			0	0	0	0	0
	HR	-	1/GF			0	0	0	0	0
	VL	0,8	15/GF	VL	10,0 OTC	0	0	**	*	0
	HL	0,3	12/GF	HL	10,0 OTC	0	0	**	**	*
20 M	VR	-	5/GF			0	0	0	0	0
	HR	10	50/GF	HR	10,0 PMT	*	**	*	0	0
	VL	-	2/GF			0	0	0	0	0
	HL	-	4/GF			0	0	0	0	0
21 M	VR	10	60/GF	VR	20,0 PMT	*	**	***	*	0
	HR	0,3	12/GF	HR	10,0 PMT	*	***	**	0	0
	VL	-	5/GF			0	0	0	0	0
	HL	-	5/GF			0	0	0	0	0
22 A	VR	0,2	15/GF			0	0	0	0	0
	HR	20	80/GF	HR	20,0 PMT	*	**	**	*	0
	VL	20	80/GF	VL	10,0 PMT	*	**	**	*	*
	HL	-	6/GF			0	0	0	0	0
23 K	VR	10	50/GF	VR	10,0 PMT	0	**	***	***	*
	HR	0,3	10/GF			0	0	0	0	0
	VL	0,2	10/GF			0	0	0	0	0
	HL	-	3/GF			0	0	0	0	0
24 M	VR	entfärbt	20/GF			0	0	0	0	0
	HR	"	30/GF	HR	10,0 PMT	0	***	***	**	0
	VL	"	-			0	0	0	0	0
	HL	"	-			0	0	0	0	0

Tabelle 3: Bakterienfluoreszenz nach intrazisternaler Tetrazyklinapplikation bei Kühen mit latenter Mastitis (Gruppe III). (+ = < 10 Kolonien; ++ = > 10 Kolonien)

Kuh Nr.	Viertel	Keimart	Behandeltes Viertel	Medikament u. Dosierung	Bakterienfluoreszenz nach	
					16	24 Std.
25 A	VR	M,S	VR	10,0 TC	++	+
	HR	M,colif.	HR	10,0 TC	0	+
	VL	S,M	-		0	0
	HL	M			0	0
26 M	VR	Str.M			0	0
	HR	"			0	0
	VL	"			0	0
	HL	"	HL	10,0 TC	+	+
27 M	VR	k.W.	-	-	0	0
	HR	Str.	HR	10,0 TC	+	+
	VL	Str.	VL	10,0 TC	0	0
	HL	Str.	-	-	0	0
28 M	VR	Str.	-	-	0	0
	HR	Str.	-	-	0	0
	VL	S,Str.	VL	8,0 OTC	++	++
	HL	S	-	-	0	0
29 K	VR	M	-	-	0	0
	HR	M	-	-	0	0
	VL	M	-	-	0	0
	HL	M,Str.	HL	10,0 PMT	0	0
30 M	VR	S	-	-	0	0
	HR	S	-	-	0	0
	VL	M	-	-	0	0
	HL	S,M,Str.	HL	20,0 PMT	++	+
31 M	VR	Str.	VR	10,0 PMT	+	+
	HR	S			0	0
	VL	-	-	-	0	0
	HL	-	-	-	0	0

Tabelle 4: Bakterienfluoreszenz nach parenteraler Tetrazyklinapplikation bei Kühen mit latenter Mastitis (Gruppe III)

Kuh Nr.	Viertel	Keimart	Medikament u. Dosierung	Applikations- art	Bakterienfluoreszenz nach					
					3	6	12	24	36	48 60 Std.
26	VR	Str., M	20,0 TC 2xtgl. für 2 Tage	i.m.	0	0	0	0	0	0
	HR	"	"	"	0	0	0	0	0	0
	VL	"	"	"	0	0	0	0	0	0
	HL	"	"	"	-	-	-	-	-	-
27	VR	k.W.	30,0 TC 1 mal	i.m.	0	0	0	0	0	0
	HR	Str.			-	-	-	-	-	-
	VL	Str.			-	-	-	-	-	-
	HL	Str.			0	0	0	0	0	0
30	VR	S	30,0 PMT 1 mal	i.m.	0	0	0	0	0	0
	HR	S			0	0	0	0	0	0
	VL	M			0	0	0	0	0	0
	HL	S.M.Str.			-	-	-	-	-	-
31	VR	Str.	30,0 PMT 2 mal tgl. für 2 Tage	i.m.	-	-	-	-	-	-
	HR	S			0	0	0	0	0	0
	VL	-			0	0	0	0	0	0
	HL	-			0	0	0	0	0	0

Tabelle 5: Zell- und Bakterienfluoreszenz bei Mäusen mit akuter Mastitis (Gruppe IV)

Kuh Nr.	Behandeltes Viertel	Keimart	Medikament		Fluoreszenz nach		Bemerkungen
			lokal	parenteral	16 Std.	24 Std.	
32	VR	Str.	20,0 TC	30,0 TC	***	***	massenhaft Bakterien u. Phagozytose
A	HR	colif.	10,0 TC	2 x i.v.	***	***	Kokken und Stäbchen
33	VR	S	10,0 TC		0	***	Bakterien und Phagozytose
HR	S	20,0 TC			0	***	
VL	S	10,0 TC			0	***	keine Bakterien
HL	S.M.	20,0 TC			0	***	
34	VR	Str.	10,0 TC		nach 72 Std.		
HR	M.Str.	10,0 TC			0	***	Bakterien
VL	M	10,0 TC			0	***	
HL	M	10,0 TC			0	***	
35	VR	S.Cory.	20,0 TC	40,0 TC	0	***	Pleomorphe Bakterien u. Phagozytose
M				i.m.			
36	VR	S.Str.	10,0 TC		**	**	Bakterien, keine Phagozytose
K							
37	VL	k.W.	20,0 TC	30,0 TC	***	***	Pleomorphe Bakterien u. Phagozytose
M				i.v.			
38	HL	k.W.	20,0 TC	30,0 TC	**	**	massenhaft Bakterien und Phagozytose
M				i.m.			
39	VL	colif.	10,0 OTC	20,0 OTC	**	**	Stäbchen u. Kokken
M				i.m.			
40	HL	Cory., S.	20,0 OTC	30,0 OTC	0	***	Pleomorphe Bakt. u. Phagozytose
A		Str., colif.		i.m.			
41	HL	k.W.	8,0 OTC	30,0 OTC	***	***	keine Bakterien
M				i.m.			
42	VR	S.	20,0 TC	20,0 PMT	**	***	Bakterien und Phagozytose
M	HR	S.	20,0 PMT	i.m.	*	***	Kokken
43	VL	colif.	20,0 PMT	2x20 PMT	**	***	Kokken u. Stäbchen
M				i.m.			
44	HR	M	20,0 PMT	30,0 PMT	***	***	primäre Tetrazyklinfluoreszenz; Bakt. u. Phagozytose
K				i.m.			

Tabelle 6: Gesamtzellgehalt und prozentualer Anteil der Epithelzellen, Granulozyten und Lymphozyten 24 Std. nach intrazisternaler Tetrazyklinapplikation bei Kühen mit chronischer Mastitis (Gruppe Va)

Kuh Nr.	Viertel	AMP	Fluoreszenz durch				
			Tetrazykline Zellzahl	Tetrazykline + Zellzahl	AO E%	AO G%	L%
45	VR	7,0	**	+++	40	60	-
	HR	7,0	*	+++	10	70	20
	VL	7,5	***	+++	30	60	10
	HL	7,5	*	+++	20	70	10
46	VR	7,5	***	++++	50	50	-
	HR	7,5	*	++	25	70	5
	VL	6,5	*	+++	10	75	15
	HL	7,0	**	++++	15	60	25
47	VR	7,5	*	+++	40	50	10
	HR	8,0	**	+++	50	40	10
	VL	8,0	*	+++	30	60	10
	HL	7,5	0	+++	20	60	20
48	VR	7,5	***	+++	20	80	-
	HR	8,0	***	++++	10	90	-
	VL	7,0	*	++	25	70	5
	HL	7,5	**	++++	15	80	5
49	VR	6,5	*	+++	30	40	20
	HR	5,5	*	+++	-	-	-
	VL	8,0	**	++	25	45	30
	HL	8,0	**	+++	50	20	30
50	VR	8,0	**	++++	50	50	-
	HR	7,0	*	+++	40	60	-
	VL	7,0	*	++	25	65	10
	HL	7,0	*	++	20	80	-

Fortsetzung Tabelle 6:

Kuh Nr.	Viertel	AMP	Fluoreszenz durch				
			Tetrazykline Zellzahl	Tetrazykline Zellzahl	+ AO E% G%	I%	
51	VR	6,5	***	+++	40	50	10
	HR	7,5	0	+++	20	80	-
	VL	6,5	*	++	50	40	10
	HL	6,5	0	++	50	30	20
52	VR	7,0	*	+++	40	40	20
	HR	7,0	0	++	20	60	20
	VL	7,5	*	++	40	60	-
	HL	7,5	0	+++	30	50	20
53	VR	8,0	**	++++	} Zelldifferen- zierung er- schwert (s.Abb7)		
	HR	8,0	**	+++			
	VL	8,0	**	+++			
	HL	8,0	***	+++			
54	VR	7,0	0	+++	15	85	10
	HR	8,0	**	++++	20	70	10
	VL	8,0	**	+++	25	60	15
	HL	6,0	0	+++	90	10	-
55	VR	-	0	+++	15	85	10
	HR	-	0	+++	10	80	10
	VL	7,5	*	++	40	55	5
	HL	7,5	*	++++	40	60	-
56	VR	8,0	*	++++	40	60	-
	HR	7,5	0	+++	35	60	5
	VL	8,0	**	++++	-	90	10
	HL	7,5	*	++++	20	80	-

Fortsetzung Tabelle 6:

Kuh Nr.	Viertel	AMP	Fluoreszenz durch				
			Tetrazykline Zellzahl	Tetrazykline Zellzahl	+ AO E% G% L%		
57	VR	8,0	**	+++	30	50	20
	HR	-	**	++++	5	90	5
	VL	8,0	***	++++	30	60	10
	HL	7,5	*	++++	20	80	-
58	VR	7,5	0	+++	20	60	20
	HR	7,5	*	+++	30	55	15
	VL	8,0	**	+++	20	80	-
	HL	7,5	*	+++	10	80	10
59	VR	6,0	**	++	20	70	10
	HR	7,5	0	+++	30	50	20
	VL	7,0	*	++	10	70	20
	HL	8,0	0	+++	40	40	20
60	VR	8,0	*	++++	30	50	20
	HR	8,0	*	+++	20	60	20
	VL	7,5	0	+++	10	80	10
	HL	7,5	**	++++	40	30	30
61	VR	5,0	0	++	30	60	10
	HR	8,0	**	+++	20	80	-
	VL	8,0	**	++++	25	50	25
	HL	-	0	++	30	70	-
62	VR	7,5	**	+++	20	70	10
	HR	7,5	0	+++	10	60	20
	VL	5,5	**	+++	30	60	10
	HL	8,0	0	+++	30	50	20

Tabelle 7: Vergleich der Fluoreszenz pathologisch veränderter Milch vor und nach Applikation von C, P, S und Tetrazyklinen (Gruppe Vb) (S = Streptomycin)

kuh Nr.	Erkranktes Viertel	makroskop. Befund	native Fluoreszenz vor Behandlung	Behandlung	Fluoreszenz	Fluoreszenz 16 Std. nach Tetrazyklinapplikation
63	VR	gelbl., flockig	homogen grün-blau	C	blaß grünl.-blau	gelbe bis goldgelbe Zellen
	HR	"	"	C	"	" 100 Zellen/GF
	VL	"	"	C	"	" Zellen, Bakt. u. Phagozytose
	HL	"	"	C	"	" ca. 100 Zellen/GF
64	VR	gelbl. Flocken	homogen unspezifisch grün-blau	P+S	grün-blau	goldgelbe Zellen u. Fibrin
	HR	grau-weiß, Flocken	"	P+S	"	"
65	HR	grau-weiß vereinz. Flocken	dito	P+S	grün-blau	Leukozyten u. Epithelien
66	VR	gelbl., breiartig	goldgelbe Zellen u. Bakterien	C	homogen blaß grün-gelb	Goldgelbe Zellen u. Detritus
	HR	"	"	C	"	"
67	HR	gelb-weiß, grobflockig karamellfarben, puddingartig	blaß grünl.-gelb	P+S	homogen blaß gelb-grün	Gelbe Zellen, Fibrin u. Detritus
	HL	"	graugelbe Zellen Bakt. u. Phagozyt.	P+S	"	"
68	VR	gelb, flockig	blaß blau-weiß	C	blaß blau-weiß	grüngelbe bis goldgelbe Zellen, Bakterien und Phagozytose
	HR	kakaofarbig, grobflockig	"	C	"	
	VL	gelbl., vereinz. Flocken	"	C	"	
	HL	"	"	C	"	
69	VL	bräunl. wäßrig, grobflockig	homogen grünl.	P+S	blau-weiß	gelbe Zellen
70	HL	gelbweiß, flockig	homogen bläul.	P+S	homogen blau-weiß	grüngelbe Zellen
71	HR	gelbl., breiartig	homogen gelbl.	P+S	blaß gelbl.-grün	goldgelbe Zellen, Bakt. u. Detritus
	HL	wäßrig, gelbl.	blau-grünl.	P+S	"	"
72	HR	blutig, stark flockig	blau-grün	C	blau-weiß	stark goldgelbe Zellen
73	VR	butterartig	homogen gelo-grün	C	homogen blaß gelb-grün	stark goldgelbe Zellen, Fibrin u. Detritus
	VL	gelbl., flockig	"	C	"	"

4. Literaturverzeichnis

1. ABERLE, S.: Basal Gastric Secretions. - A Study in Yellow-Orange Fluorescence: J. Amer. Med. Ass: 185: (1963), 777
2. -- : The Tetracycline Fluorescence Test in Differential Diagnosis of Gastric Disease: GASTROENTEROLOGY (Baltimore), 44: (1963), 933-934
3. ALBRIGHT, J.L., S.L. TUCKEY, & G.T. WOODS: Antibiotics in Milk: J. Dairy Sc. 44: (1961), 772-807
4. ARNOLD, J.: Über Plasmastrukturen und ihre Bedeutung: G. Fischer, Jena. (1914). zit. nach Mayer u. Klein. (95)
5. BACHMANN, W.: Z. Infektionskrankh. Haustiere: 42: (1932), 225. zit. nach Schönherr (129)
6. BAILEY, R.W., & P.D. LEVIN: Tetracycline Localization in certain neoplasms of Bone. Surg. Forum 12: (1961), 455-457
7. BAFI-YEBOA, M.: Vergleichende Untersuchungen über die flammenspektrophotometrische Chlorbestimmung und den Zellgehalt in Kuhmilch: Vet. Diss. Giessen 1968
8. BAUMGARTEN u. E. GILDEMEISTER: Teilergebnisse bei der Bekämpfung der Rindertuberkulose im Lande Bremen. Zugleich ein Vergleich zwischen den Untersuchungsergebnissen der Ziehl-Neelsen Methode und der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nach Dr. Gohde: Monatshefte für prakt. Tierheilkunde: Band 4, (1952), 221
9. BEIL, B.: Studium über den Zellgehalt der Milch und seine Bestimmung: Landw. Diss. Giessen, 1955
10. BENDA, C.: Derm. Z. 1: (1893), 34. zit. nach Mayer und Klein (95)
11. BERK, J.E., S.M. KANTOR: Demethylchlortetracycline-induced Fluorescence of Gastric Sediment. Use to Differentiate Benign and Malignant Gastric Lesions: J. Amer. Med. Ass. 179: (1962), 997-100
12. BERK, J.E.: Der Tetrazyklin-Fluoreszenztest zum Nachweis des Magencarcinoms: TRIANGEL Sandoz 6: (1963-65), 22-25

13. BERK, J.E.: Additional Comment on the Tetracycline Fluorescence Test in Differential Diagnosis of Gastric Disease: GASTROENTEROLOGY 45: (1963), 586-587
14. BERTALANFFY, L. v. F. D. BERTALANFFY: Die Fluoreszenzmethode in der exfoliativen Cytologie, besonders der Diagnose des Lungenkrebs: Naturwiss. 47: (1960), 165-166
15. BLACKBURN, P.S., C.M. LAING, and D.F.MALCOLM: J. Dairy Res. 22: (1955), 37. zit. nach Rüttmann (113) und Gaudlitz u. Czernicki (48)
16. BLOBEL, H. und C.W. BURCH: Oxytetracycline Concentration in Blood Serum and Milk Secretions of Cows Following Intramammary or Intravenous Treatment: J. Amer. Vet. Med. Ass. 137: (1960), 701
17. BOURGEOIS, E.: Le Lait 7, Nr. 66/67: (1928), zit. nach Schönherr (129)
18. BOTTIGER, L.E.: On the Distribution of Tetracyclines in the Body: Antibiot. and Chemotherap. 5: (1955), 332-339
19. BREED, R.: J. Infect. Dis. 14: (1914), 93. zit. nach Wahby (145)
20. CARTER, R.L., E.E. FLOYD, and I. COHN: Tetracycline Fluorescence in Tumors and Colon Washings: Surg. Forum 13: (1962), 96-97
21. CHRISTIANSEN, W.: Milchwirtsch. Forschung 7: (1929), 233. zit. nach Schönherr (129)
22. COTT, H.P.: Untersuchungen über die Reizwirkung moderner Mastitispräparate auf das Milchdrüsengewebe unter besonderer Berücksichtigung der Breitbandantibiotika: Vet. Med. Diss. F.U. Berlin, (1961)
23. CULLEN, G.A.: The Use of Electronic Counters for Determining the Number of Cells in Milk: Vet. Rec. 77: (1965), 858
24. -- : A Method of Counting Cells in Milk using Electronic Cell Counters: Vet. Rec. 80: (1967), 188
25. DÄMMRICH, K.: Die Eigenfluoreszenz der Tetrazykline und ihre Anwendung bei der Untersuchung des Skeletts: Berl. u. Münchner Tierärztl. Wschr. 16: (1969), 309-311

26. DENZLER, B.: Beiträge zur Analyse der Fluorochromierung von Bakterien: Diss. Tierärztl. Hochschule, Hannover 1942
27. DIAMOND, L.: Cellular Uptake of Chloramphenicol as revealed by Fluorescence Microscopy: NATURE (Lond.) 199: (1963), 90-91
28. DIERNHOFER, K.: Diagnostik der Euterentzündungen: Wiener Tierärztl. Monatschr. 37: (1950), 809-866
29. DRAWERT, H. und U. RÜFFER-BOCK: Fluorochromieren von Endoplasmatischem Reticulum, Dictyosomen und Chondriosomen mit Tetracyclin: Ber. dtsch. bot. Ges. 77: (1965), 440-449
30. DU BUY, H., und J. L. SHOWACRE: Selective Localisation of Tetracyclines in Living Cells: Science 133: (1961), 196-197
31. DU BUY, H., F. RILEY, und J. L. SHOWACRE: Tetracycline Fluorescence in Permeability Studies of Membranes around Intracellular Parasites: Science 145: (1964), 163-165
32. DUNHAM, R.E.: Die Wirkung von Gentamycin im Experiment und bei der Mastitis des Rindes: Vet. Diss. Giessen 1967
33. EDELMÜLLER, R.: Zellgehalt im Vorkolostrum vergleichend zum Kolostrum der Kuh: Vet. Med. Diss. Wien, (1952). zit. nach Heidrich u. Renk (62)
34. EDER, H.: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Eosinophilengranula mit Anilinblau: BLUT 4: (1958), 332-335
35. -, - : Eine neue Zählmethode für eosinophile Leukozyten: Klin. Wschr. 37: (1959), 714-716
36. -, - : Fluoreszenzmikroskopische Eosinophilendiagnostik: LEITZ-Mitt. Wiss. u. Tech. 4: (1960), 113-117
37. -, - : Fluoreszenz-cytophotometrische Untersuchungen an lebenden Lymphozyten: Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi, Giessen, 1966
38. EDER, H., und H. FRITSCHKE: Zur Farbphotographie fluoreszenzmikroskopischer Objekte: LEITZ-Mitt. Wiss. Tech. 2: (1963), 143-145
39. EGER, W., F. GÖTZ u. H. KÄMMERER: Herstellung von Dünnschliffen aus Knochen und Weichgewebe nach Markierung mit Tetrazyklinen: Langenbecks Arch. Klin. Chir. 306: (1964), 205

40. EGER, W., H. KÄMMERER und G. BOTHMANN: Experimentelle Beiträge zur Tetrazyklinablagerung in den Zähnen: Dt. Zahnärztl. Zschr. 20: (1965), 828
41. EICHLER, J. und F. WALTER: Ein Beitrag zur Fluoreszenzmikroskopie des Knochengewebes: LEITZ-Mitt. Wiss. u. Tech. Heft 4 Bd. IV: (1967), 110-114
42. EIS, H.: Untersuchungen über die Fluoreszenzmikroskopische Differenzierung von Tuberkelbakterien und apathogenen Mykobakterien in der Milch: Vet. Med. Diss. Giessen, 1954
43. ENGELBART, K., D. GERICHKE und A. SÖDER: Tierexperimenteller Beitrag zur Frage der Einlagerung von Tetracyclin in Tumorgewebe: Z. Krebsforschung 66: (1964), 310-315
44. ERNST, W.: Grundriß der Milchhygiene, 2. Aufl. Verlag F. Enke, Stuttgart, 1926, zit. nach Schulze-Petzold (131) und Schönherr (129)
45. FINERMAN, G.A.M. und R.A. MILCH: In vitro binding of Tetracycline to Calcium: Nature (Lond.) 198: (1963), 486-487
46. FROST, H.M., A.R. VILLANUEVA, H. ROTH und S. STANISAVLJEVIC: Tetracycline bone labelling: J. New Drugs 1: (1961), 206
47. GASPARIN, J.H.: Vergleichende Untersuchungen über Reaktion, Säuregrad und Katalase des Vorkolostrums und Kolostrum der Kuh: Vet. med. Diss. Wien (1953), zit. nach Heidrich und Renk (62)
48. GAUDLITZ, K. und B. CZERNICKI: Mastitisprobleme und Eutergesundheitsdienst: Sonderdruck-Hessisches Ministerium für Landwirtschaft und Forsten, Wiesbaden (1970), 1-12
49. GOHDE, G.: Zur hygienischen Milchbeurteilung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie: Berl. und Münchener Tierärztl. Wschr. 11/12: (1944), 94
50. GRAF, F.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Bakterien in der Milch: Vet. Diss. Hannover, (1938)
51. GRAF, H. und G. BERGMANN: Med. Klinik 58: (1963), 1722, zit. nach Walter u. Heilmeyer (148)
52. GRASSI, L.: Milchw. Forschungen 15: (1933), 142. zit. nach Beil (9) u. Schönherr (129)

53. GRYNFELTT, J.: Étude Histologique des Phénomènes Sécrétoires de la Glande Mammaire - Thèse Médecine, Montpellier (1936). zit. nach Mayer und Klein (95)
54. HAITTINGER, M.: Fluoreszenz-Mikroskopie. 2. Aufl. Akademie Verlag Leipzig: (1960)
55. HAGEMANN, P.K.H.: Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münchner Med. Wschr. 85: (1938), 1066-1068
56. HAMBURGER, M.J., and J. CARLETON: J. Lab. clin. Med. 49: (1957), 276. zit. nach Walter und Heilmeyer (148)
57. -, - und M. HARCOURT: Antibiot. and Chemotherap. 7: (1957), 274. zit. nach Walter und Heilmeyer (148)
58. HASH, J.H., M. WISHNICK, and P.A. MILLER: J. biol. chem. 239: (1964), 2070. zit. nach Walter und Heilmeyer (148)
59. HAUKE, K.: Arch. Exp. Vet. Med. 18: (1964), 557. zit. nach Schönherr (129)
60. HAVEMANN, K.: Tetrazyklinfluoreszenz von Magen- und Bronchialsekreten zur Tumordiagnose: 69. Tg. Dtsch. Ges. Innere Med. = Verhandlung der Dtsch. Ges. für Innere Medizin, Wiesbd: (1963)
61. HÄKKINEN, I. und K. HARTIALA: Fluorescence of Tetracyclines in experimental Ulcers and regenerating tissue injuries: Ann. Med. exp. Fenn 27 (1959), 115-120
62. HEIDRICH, H.J., and W. RENK: Krankheiten der Milchdrüse bei Haustieren: Verlag Paul Parey Berlin u. Hamburg (1963)
63. HEMPERL, H.: Über Fluoreszenzmikroskopie: Ciba-Symposion 2: (1961), 50-63
64. HEWLETT, R.T., S. VILLAR, and C. REVIS: J. Hyg. Camb. 2: (1909), 271. zit. nach Wahby (145)
65. HILLMANN, C.: Studien über Veränderungen in der Zusammensetzung und den Eigenschaften der Kuhmilch im Verlauf einer Laktationsperiode: Landw. Diss. Giessen 1956
66. HOGH, P., and R. RASMUSSEN: Concentrations of oxytetracycline in Blood Plasma and Milk after Parenteral Application of Terramycin in Cows. Vet. Bull. 35: (1965), 385. Ref. Nord. Vet. Med. 16: (1964), 997-1003

67. HÖRICH, B.: Vergleichende Ergebnisse im Rahmen der systematischen Kontrolle der chronischen Mastitis: Vet. med. Diss. Giessen 1968
68. IBSEN, K.H., and M.R. URIST: Complexes of Calcium and Magnesium with Oxytetracycline: Proc. soc. exp. Biol. 109: (1962), 797
69. JAARTSVELD, F.H.J.: Diss. Utrecht (1961), zit. nach Bafieboea (7) und Hörich (67)
70. JENSEN und G. GOHDE: Die fluoreszenzmikroskopische Selektivdarstellung des Tuberkelbazillus: 1. Mitteilung. Der Tuberkulosearzt 4: (1950), 703. zit. nach Lämmle (87)
71. JUNG, H.: Zum Wert der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Milchproben bei Verwendung von Akridinorange als Fluorochrom: Vet. Diss. Hannover, (1947)
72. KIELWEIN, G. und H. JOHNE: Untersuchungen über eine aus dem Prinzip des California Mastitis-Testes abgeleitete Mastitisprobe: Tierärztl. Umschau 23: (1968), 204-212
73. KING, N.: Fluorescence Microscopy of Fat in Milk and Milk Powder: J. Dairy Res. 22: (1955), 205-210
74. KLIMMER-SCHONBERG: Milchkunde und Milchhygiene. 6. Aufl. Verlag M. & H. Schaper, Hannover (1955)
75. KLIMA, H.: Einsatz der fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung im Eutergesundheitsdienst: Vortrags-Tagung der Dtsch. Ges. für Milchwissenschaft Giessen, März 1970
76. KLINGER, J. und R. KATZ: Tetracycline Fluorescence in the Diagnosis of Gastric Carcinoma. Preliminary Report: Gastroenterology 41: (1961), 29-32
77. KOESTLER, G.: Zum Nachweis der durch Sekretionsstörung veränderten Milch. Milchwirtschaftl. Zbl. 49: (1920), 217-222. zit. nach Heidrich u. Renk (62)
78. KON, S.K., and A.T. COWIE: MILK: The Mammary Gland and its Secretion. Vol. 1. Academic Press, New York and London 1961
79. KOSENOW, W.: Die Fluorochromierung mit Akridinorange. - Eine Methode zur Lebendbeobachtung gefärbter Blutzellen: Acta Haemat. 7: (1952), 217

80. KOSENOW, W.: Lebende Blutzellen in Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop: S. Karger, Basel-New York 1956
81. KUEMMERLE, H.P. und H. CONTZEN: Experimentelle Studie zum Verteilungsproblem der Antibiotika (Tetrazyklin-derivate) und neuerer Sulfonamide im pathologisch veränderten Gewebe des Menschen. Chemotherapie (Basel) 4: (1962), 535-562
82. KUNIN, C.M.: Pediat. clin. N. America 8: (1961), 1001.
zit. nach Walter u. Heilmeyer (148)
83. KUWILSKY, S.: Persönliche Mitteilungen (1969) und Vortrag über "Die fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung von Milchezellen": Tagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft Giessen, März 1970
84. LAAS, E.: Der Ablauf der Tetrazyklinfluoreszenz im Menschen. Zbl. allg. Path. Anatomie 103: (1962), 128
85. LAGEMANN, H.: Über die Auswirkung des Blindmelkens auf den Zellgehalt der Milch. Vet. Diss. München, 1966
86. LAING, C.M., and J.F. MALCOLM: The Incidence of Bovine Mastitis with Special Reference to the Non-specific Condition. Vet. Rec. 68: (1956), 447-455
87. LÄMMLER, G.: Der Fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Tuberkelbakterien in der Milch und ihre Differenzierung. Vet. Diss. Giessen (1952)
88. LÄMMLER, G. und H.R. SCHÜTZE: Vital-Fluorochromierung tierischer Zellkerne mit einem neuen Fluorochrom. Die Naturwissenschaften 56: (1969), Heft 5, S. 286
89. LEIDL, W., O.S. SCHALM und P. LÜPS: Die Zellzahlbestimmung in der Milch nach Prescott und Breed und ihre Fehlermöglichkeiten. Milchwissenschaft 16: (1961), 557-565
90. LERCHE, M.: Lehrbuch der tierärztlichen Milchuntersuchung. Verlag Paul Parey. Berlin und Hamburg 1966
91. MALATYAN, M.N.: Demonstration in vivo of Mitochondria in Bacteria. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 145: (1962), 955-957

92. MALEK, P., J. KOLC, F. ZAK, and V.L. ZASTAVA: New Aspects of tetracycline analogues distribution and fixation in pathologically changed tissue. *Chemotherapia (Basel)* 5: (1962), 269-276
93. -, - : Fluorescence of Tetracycline Analogues fixed in Myocardial Infarction. *Cardiologia (Basel)* 42: (1963), 303-318
94. MALT. zit. nach Udenfriend, 1969 (142)
95. MAYER, G., and M. KLEIN: Histology and Cytology of the Mammary Gland. Milk: The Mammary Gland and its Secretion, S.K. Hon & A.T. Cowie, Academic Press, New York & London, vol. 1 (1961), 47-126
96. McLEAY, J.F., and B.R. WALSKE: Relationship of Tetracycline to Carcinoma. *Ann. Surg.* 156 (1962), 313-317
97. MILCH, R.A., D.P. RALL, and J.E. TOBLE: Bone Localisation of the Tetracyclines. *J. Nat. Cancer Institute*, 19: (1957), 87-91
98. MÖNNIG, H.: Zellgehalt und Lymphozytenanteil in der Milch eutergesunder Kühe und ihre Verwertbarkeit für die Diagnose der Rinderleukose. *Vet. Med. Diss. Hannover* 1967
99. MOSSNER, G., S. WELLER und H. MAURER: Therapiewoche 14, (1964), 381, zit. nach Walter und Heilmeyer (148)
100. MÖSSNER, G., F. WÖHLER, H. MAURER, und W. OTTE: Arzneimittelforsch. 15: (1965), 75. zit. nach Walter u. Heilmeyer (148)
101. MOURSY, A.W., & G. OBIGER: *Milchwiss.* 15: (1960), 500. zit. nach Schönherr (129)
102. MÜNCHBERG, F.: Blaulicht-fluoreszenzmikroskopische Leukozyten- und Keimgehaltsbestimmung in der Milch: *Mikroskopie Bd. 6*: (1951), 188-190
103. OBIGER, G.: Mastitisdiagnose. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.* 14: (1962), 307-325
104. OGAA, J.S., B. CZERNICKI u. H. TILLMANN: Unveröffentlicht
105. OWEN, L.N.: Fluorescence of Tetracycline in bone Tumors normal bone and teeth: *Nature (Lond.)* 190: (1961), 500-502
106. PETERS, Th.: Persönliche Mitteilungen, 1970

107. PHILLIPS, J.W., E.G. COBB, V. RICHARDS, etc.: The Deposition and Retention of Tetracycline in Cancer: Amer. J. Surg. 100: (1960), 384-388
108. PRESCOTT, S.C. & R.S. BREED: The Determination of the Number of Body Cells in Milk, by a Direct Method: J. Infect. Dis. 7: (1910), 632-640
109. PULASKI, E.J. & K. ISOKANE: Antibiot. Med. 4: (1957), 408. zit. nach Walter u. Heilmeyer (148)
110. RALL, D.P., Ti Li LOO, M. LANE & M. G. KELLY: Appearance and Persistence of Fluorescent Material in Tumor Tissue after Tetracycline Administration: J. Nat. Cancer Institute 19: (1957), 79-84
111. RANDALL, W.A., C.G. DURBIN, J. WILMER, & J. H. COLLINS: Antibiotics Concentration and Duration in Animal Tissue and Body Fluids. 1. Blood Serum and Milk of Cows: Antibiotics Ann. (1953-54), 421
112. RASCH, K. und J. GÖSLING: Ist das fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsverfahren nach Dr. Gohde zum Einbau in die Bekämpfung der Eutertuberkulose des Rindes geeignet? D.T.W.: (1951), 371. zit. nach Lämmler (87)
113. REUSSE, U.: Über die Ausscheidung von Arzneimitteln mit der Milch und die Dauer der Ausscheidung: Dtsch. Tierärztl. Wschr. 68: (1961), 183-186 & 240-243
114. RÜTTIMANN, G.: Untersuchungen über die Bedeutung des Zellgehaltes der Milch für die Bakterienvermehrung: Vet. med. Diss. Bern 1966
115. SANDLOW, L.J. & H. NECHELES: Tetracycline Fluorescence in Detecting Malignancy: J. Amer. Med. Ass. 189: (1964), 363-365
116. SEELEMAN, M. & G. OBIGER: Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber. 14 (1962), 265
117. SEELEMAN, M. & A. MAYER: Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber. 15: (1963), 197
118. SEELEMANN, M.: Über den Zellgehalt der Milch, seine Feststellung, Bedeutung und Beurteilung: Milchwiss. 19: (1964), 184-194
119. SINELL, H.J.: Bestandteile der Milch - in M. Lerche: Lehrbuch der tierärztlichen Milchuntersuchung. Verlag Paul Parey-Berlin-Hamburg, 1966, S. 21-49

121. SHERMAN, H.H., M.H. SUKOFF, C. CHRYSSANTHOU, D. MININBERG, E.M. BECKMAN, and M. WEINGARTEN: Tetracycline Fluorescence in the Diagnosis of Gastric Carcinoma: GASTROENTEROLOGY 45: (1963), 84-89
121. SPITZY, K.H.: Antibiot. et Chemother. (Basel) 10: (1962), 193
122. SCHALM, O.W. & D.D. NOORLANDER: Experiments and Observations leading to the Development of the California Mastitis Test: J. Amer. Vet. Med. Ass. 130: (1957), 199-204
123. SCHAUMANN, W.: Über die Eignung der Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis des Erregers der Rindertuberkulose in der Milch und anderen Sekretproben. Vet. med. Diss. München (1952)
124. SCHIFFER, L.M.: Fluorescence Microscopy with Acridine Orange. - A Study of Haemopoetic Cells in Fixed Preparation. BLOOD 19: (1962), 200-207
125. SCHIPPER, I.A.: Milk and Blood Levels of Chemotherapeutic Agents in Cattle. J. Amer. Vet. Med. Ass. 147: (1965), 1403-1407
126. SCHMIDT MADSEN, P.: Determination of Milk somatic Cells using Fluorescence Microscopy: (A Preliminary Report) Acta. vet. Scand. 2: (1968), 376-377
127. SCHOLZ, A.: Quantitativ-morphologische Untersuchungen zur Inaktivitätsosteoporose. Med. Diss. Giessen: (1969)
128. SCHÖNBERG, F.: Zur Brauchbarkeit der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Vitalgefärbten Milchsedimentes: Dtsch. tierärztl. Wschr. 53: (1946), 147
129. SCHONHERR, W.: Tierärztliche Milchuntersuchung. S. Hirzel Verlag Leipzig: (1965)
130. SCHÜMMELFELDER, N.: Grundlagen und Anwendungen der Fluoreszenz-Mikroskopie, Zyto- und Histochemie in der Hämatologie: Neuntes Freiburger Symposium 1962. (Springer-Verlag: Berlin. Göttingen. Heidelberg: (1963), 88-105)
131. SCHULTZE-PETZOLD, H.: Beitrag zur zytologischen Beurteilung der Milch: Berliner u. Münchener Tierärztl. Wschr. 18: (1960), 349-352
132. STOCKINGER, L.: Fluoreszenzuntersuchungen an Gewebekulturen 1. Die metachromatische Vitalfluoreszenz mit Akridinorange: Z. Naturforschg. 13b: (1958), 407

133. STOCKINGER, L.: Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischen Zellen: Protoplasmatologia. Hdb. d. Protoplasmaforschung Bd. II, Dt. Springer, Wien (1964)
134. TAYLOR, J.H., J. NELSON, and R.B. BANKS: Antibiotics in Milk. Vet. Rec. 76: (1964), 261-2
135. TILLMANN, H.: Persönliche Mitteilungen (1968-70) und Ausführungen im Rahmen des Seminars Eutergesundheitsdienst für beamtete Tierärzte: April 1969
136. TOBIE, J.E. & H.K. BEYE: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104: (1960), 137. zit. nach Udenfriend (1962), (141)
137. TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN: Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Milchezellen: Milchwiss. 21 (1966), 93
138. -, - : Die elektronische Mikrozählung - ein Verfahren zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Qualität der Rohmilch: Milchwissenschaft 23: (1968), 65
139. TOLLE, A., H. ZEIDLER, W. HEESCHEN, J. KRAAK & J. REICHMUTH: Untersuchungen über somatische Zellen, saprophytäre Keime, und antibiotisch wirksame Hemmstoffe in der Rohmilch aus 12 Einzugs-Gebieten der BRD. Kieler Milchwirtsch. Forsch.Ber. 20: (1968), 343-394
140. TOLLE, A.: 9. Deutscher Tierarzt Tag: Köln 1969
141. UDENFRIEND, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine Vol.1: (1962), S. 409-411. Acad.Press. London and New York.
Vol.2: (1969). S. 505-508 u. 555-556. Acad. Press. New York & London
143. VARRIER-JONES, P.C.: Lancet 207: (1924), 537. zit. nach Wahby (145)
144. VASSAR, P.S., A.M. SAUNDERS & C.F.A. CULLING: Tetracycline Fluorescence in Malignant Tumors and Benign Ulcers: Arch. Path. 62: (1960), 613-616
145. WAHBY, A.M.: Reaction, Chloride-content and Cell Count and Types of Normal Buffalo Milk. Zbl. Vet. Med. 1: (1954), 773-781
146. -, - : Counterstaining of Milk in the Test Tube, 123 Zentralbl. Vet. Med. Reihe B. 10: (1963), 173-9
147. WAHBY, A.M., and S. NASR: A Rapid Laboratory Method for the Diagnosis of Bovine Mastitis: Zbl. Vet. Med. 4: (1957), 341-258

148. WALTER, A.M. und L. HEILMEYER: Antibiotika-Fibel. 2. Aufl. G. Thieme Verlag Stuttgart (1965), S. 202-236
149. WEATHERFORD, H.L. & EMMEL, V.E.: Anat. Rec. 27: (1924), 191. zit. nach Mayer und Klein (95)
150. WEYMAN, J. und J. R. PORTEOUS: Verfärbung der Zähne durch Tetracyclin: Münchener Med. Wochenschr. 1964, S. 963. Orig. Brit. Dent. J. 115: (1963), 499
151. WILDE, W.: Über den Zellgehalt der Milch gesunder Tiere. Vet. Diss. Leipzig, 1938
152. WINKLER, W.: Z. Landw. (Österreich) 11: (1908), 562. zit. nach Wahby (145)
153. WIRTH, K.: Jahresberichte für Vet. Med. 50: (1931), Ref. 1356. zit. nach Schönherr (129)
154. WITTEKIND, D.: Über die derzeitige Bedeutung der Vitalfärbung speziell der Vitalfluorochromierung in der Cytologie und über Möglichkeiten ihrer weiteren Anwendung insbesondere in Kombination mit anderen Methoden. Mikroskopie 14: (1959), 9-25
155. -, - : Über die Bedeutung der Vitalfluorochromierung für die Hämatologie und für die Beurteilung zytologischer Effekte in der Zytologie. Neuntes Freiburger Symposium 1962. Herausg.: Springer: Berl.-Gött.-Heidelberg 1963
156. YEARY, R.: The Excretion and Distribution in Body Fluids of Tetracycline following intravenous Administration to Dogs: J. of Pharmacol. and Exptl. Therapeutics. 140: (1963), 258-266
157. ZEIGLER, K.: Physikochemische Forschungsberichte der histologischen Methodik: Wissensch. Forschungsberichte 48: (1938)
158. ZINN, E.: Untersuchungen der Milch gesunder Tiere auf den Zellgehalt. Vet. Diss. Berlin (1937)
159. ZLOTNIK, J.: J. Comp. Path. & Therap. Vol. 57: Nr. 3 (1947) 196. zit. nach Wahby (146)

5. Lebenslauf

Am 11. 3. 1941 wurde ich, Judah, Saul O g a a , als Sohn des Landwirtes und Katecheten Saulo Abua und seiner Ehefrau Esta Drania NaOdobí in Luba (Uganda) geboren.

Nach Besuch der Rhino-Camp Primary School von 1948 bis 1953, der Arua Junior Secondary School von 1954 bis 1955 sowie der Sir Samuel Baker Senior Secondary School in Gulu, legte ich dort 1959 das "Cambridge Overseas School Certificate Examen" ab.

Im Juli 1960 wurde ich für zwei Jahre zum Studium am Makerere University College of the University of East Africa zu Kampala in Uganda zugelassen und bestand im März 1962 das "Preliminary Examination in Science" der University of London.

Mit dem Studium der Veterinärmedizin begann ich im Juli 1962 am University College, Nairobi, der University of East Africa in Kenya, das ich im März 1966 mit der Tierärztlichen Prüfung abschloß, unter Erlangung des Grades eines Bachelor of Veterinary Science (B.V. Sc.).

Bis Mai 1967 war ich als District Veterinary Officer im Staatsdienst in Uganda tätig, anschließend als Assistent im Department of Clinical Studies der Veterinärmedizinischen Fakultät in Nairobi.

Im Februar 1968 kam ich im Rahmen der Universitätspartnerschaft zwischen den Universitäten in Giessen und Nairobi nach Deutschland. Dort besuchte ich zunächst einen viermonatigen Sprachkurs am Goethe-Institut in Schwäbisch-Hall. Danach absolvierte ich einen weiteren Deutschkurs an der Justus Liebig-Universität in Giessen.

Seit dem 1. Juni 1968 bin ich an der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Veterinärklinik der Justus Liebig-Universität Giessen tätig. Im Wintersemester 1968/69 und im Sommersemester 1969 belegte ich Vorlesungen an der Veterinärmedizinischen Fakultät.

Am erfreulichsten war bei dieser Arbeit die großzügige Hilfe, die ich von vielen Seiten erhalten habe. In erster Linie bin ich Herrn Professor Dr. Harry T i l l m a n n verpflichtet für die Überlassung des Themas sowie für seine ständige Anregung, Kritik, sein persönliches Interesse und seine Ratschläge bezüglich der Arbeit.

Ich danke ihm besonders dafür, daß er es mir in seiner Eigenschaft als Partnerschaftsbeauftragter für die Universitätspartnerschaft zwischen den Universitäten in Gießen und Nairobi ermöglichte, an seiner Klinik zu arbeiten, seine Gastfreundschaft zu genießen und seiner wissenschaftlichen Hingabe und seinem Arbeitseifer beizuwohnen, was für mich sehr anregend und förderlich war.

Frau Dr. Brigitte C z e r n i c k i , Akademische Oberrätin der Klinik, bin ich zutiefst zu Dank verpflichtet für ihre unermüdliche wissenschaftliche Betreuung, fortgesetzte persönliche Ermutigung und Anregung sowie ihre unschätzbare Hilfe, Geduld und Bereitwilligkeit, insbesondere bei der Übersetzung und Abfassung des Textes.

Ferner möchte ich meinen ergebenen Dank gegenüber Herrn Dr. Siegfried K u w i l s k y , dem Direktor des Staatlichen Veterinäruntersuchungsamtes in Gießen, zum Ausdruck bringen, der mich freundlicherweise an seinem Institut in die Technik der Fluoreszenzmikroskopie einführte.

Herrn Balla K e i t a bin ich dankbar für die Übersetzung der französischen Zusammenfassung.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen Angehörigen der Klinik für die erfreuliche Kooperation während der Zeit meines Aufenthaltes.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641 77449